

Funktionsanalyse des Lypd6-Gens in transgenen Mäusen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Martin Darvas

aus

Aachen

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

1. Referent: Prof. Dr. Andreas Zimmer

2. Referent: Prof. Dr. Horst Bleckmann

Tag der Promotion: 13. 12. 2007

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Acc.	<i>Accessionnumber</i>
Amp	Ampicillin
ANT	<i>Antarctic phosphatase</i>
Ap ^R	Ampicillinresistenz
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>copy</i> Desoxiribonukleinsäure
cRNA	<i>copy</i> Ribonukleinsäure
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DIG-dUTP	Digoxigenin-markiertes Desoxyuridintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ePCR	elektronische PCR
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyddehydrogenase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)
ID	Identität
IPTG	Isopropylthiogalactosid

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kd	<i>Knockdown</i>
LacZ	Gen für β -Galaktosidase
LB	Luria Bertani
LOG	Dekadischer Logarithmus
MCS	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
<i>M.musculus</i>	<i>Mus musculus</i> (Hausmaus)
Neo ^R	G418-Resistenz
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
<i>P.borealis</i>	<i>Pandalus borealis</i> (Tiefseegarnele)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-CMF	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung - Calcium Magnesium frei
pCMV	Zytomegalievirus-Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>R.norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotation pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	<i>standard saline citrate</i>
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SV40	<i>Simian virus</i> 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Unit (Enzymeinheit)
UV	ultraviolett
UTR	nichttranslatierte Region
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
Zeo	Zeocin
ZNS	Zentralnervensystem

„Ein-Buchstaben“-Aminosäurekode

A	Alanin
C	Cytosin
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Neuropeptide und Neuromodulation	1
1.2	Das 'Riken Mouse Gene Encyclopedia Project'	2
1.3	Gen-Überexpression und Herstellung von <i>Knockdown</i> -Mäusen.....	3
1.4	Ziele der Arbeit.....	4
2.	MATERIAL	5
2.1	Geräte 5	
2.2	Objektträger	6
2.3	Software.....	6
2.4	Reagenzien und Chemikalien	6
2.5	Enzyme	6
2.6	Molekulargewichtsstandards.....	6
2.7	Oligonukleotide	6
2.8	Kits 9	
2.9	Antikörper und Antisera.....	10
2.10	<i>Escherichia coli</i> -Bakterienstämme	10
2.11	Plasmide	11
2.12	DIG-markierte Sonden	12
2.13	Eukaryotische Zelllinien	13
2.14	Mausstämme.....	13
2.15	Zellkulturmedien.....	13
2.16	Nährmedien für die Kultivierung von <i>E.coli</i>	13
2.17	Verwendete Lösungen	14
3.	METHODEN	21
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	21
3.1.1	DNA-Restriktion	21
3.1.2	Anlagerung von komplementären Oligonukleotiden.....	21
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21

3.1.4	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide.....	22
3.1.5	Ligation von PCR-Produkten.....	23
3.1.6	Präparation von Plasmid-DNA	23
3.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	23
3.1.8	Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	23
3.1.9	<i>Southern-Blot</i>	24
3.1.10	Isolierung von RNA	25
3.1.11	RNA-Elektrophorese	25
3.1.12	<i>Northern-Blot</i>	26
3.1.13	<i>In situ</i> -Hybridisierung	26
3.1.14	Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	28
3.1.15	<i>Real-time</i> PCR	28
3.1.16	Sequenzierung von DNA.....	29
3.1.17	Reverse Transkription	29
3.1.18	Isolierung von Proteinen aus Geweben	29
3.2	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	30
3.2.1	Proteinbestimmung	30
3.2.2	Immunfärbung von Säugerzellen	30
3.2.3	Immunpräzipitation.....	30
3.2.4	Protein-Gelelektrophorese und <i>Western-Blot</i>	30
3.3	Zellkultur-Methoden	31
3.3.1	Allgemeine Zellkulturmethoden	31
3.3.2	Passage von Säugerzellen	32
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	32
3.3.4	Einfrieren und Lagerung von adhärenenten eukaryotischen Zellen	32
3.3.5	Auftauen von Zellen	32
3.3.6	Mycoplasmen-Test.....	32
3.3.7	DAPI-Färbung	33
3.3.8	Transfektion von somatischen Zellen mit Plasmiden	33
3.3.9	Transfektion von somatischen Zellen mit siRNA	33
3.3.10	Selektion von transgenen Zellen.....	33
3.3.11	Klonierung von somatischen Zellen	34
3.3.12	Durchflusszytometrie am FACS	34
3.4	Versuchstiere	35

3.4.1	Zucht und Haltung der Mäuse	35
3.4.2	Herstellung von transgenen Mäusen.....	35
3.4.3	Organentnahme	35
3.5	Verhaltensbiologische Methoden	36
3.5.1	Allgemeine Verhaltenstests.....	36
3.5.1.1	Allgemeiner Verhaltenstest nach Irwin	36
3.5.1.2	Offenfeld	37
3.5.1.3	Heimatkäfig-Aktivität	37
3.5.2	Aggressionstest.....	38
3.5.2.1	<i>Resident-intruder</i> Test.....	38
3.5.3	Testverfahren zur Messung der Leistung des Arbeitsgedächtnis.....	38
3.5.3.1	Y-Labyrinth.....	38
3.5.4	Tests zur Messung von Angstverhalten	39
3.5.4.1	Schreckreaktion (' <i>Startle response</i> ')	39
3.5.4.2	Offenfeld	39
3.5.5	Test zur Messung von sensomotorischem <i>Gating</i>	40
3.5.5.1	Präpulsinhibition (PPI).....	40
3.5.6	Tests zur Nozizeption.....	40
3.5.6.1	Brennstrahl-Test (' <i>Tail-flick</i> ').....	40
3.5.6.2	Wärmeplatten-Test (' <i>Hot plate</i> ')	41
3.5.6.3	Krümm-Test (' <i>Writhing</i> ')	41
3.6	Interaktion mit Neurotransmittersystemen.....	41
3.6.1	Neurotransmittersystem Katecholamine	42
3.6.1.1	Ritalin	42
3.6.1.2	Amphetamin.....	42
3.6.2	Neurotransmittersystem Glutamat.....	43
3.6.3	Neurotransmittersystem Acetylcholin	43
3.6.3.1	Einfluss von Nikotin auf lokomotorisches Verhalten.....	43
3.6.3.2	Nikotin-induzierte Analgesie.....	44
3.7	Elektrophysiologische Methoden	44
3.8	Statistische Methoden.....	44
3.9	Verwendete Datenbanken und Programme	45
4.	ERGEBNISSE	48

4.1	Auswahl der Kandidatengene für die Expressionsanalyse.....	48
4.2	Expressionsanalyse der 39 Kandidatengene	50
4.3	Das murine Lypd6-Gen	51
4.3.1	Chromosomale Lokalisierung des murinen Lypd6–Gens.....	51
4.3.2	Der murine Lypd6-Genlokus	51
4.3.3	Genomische Organisation des murinen Lypd6-Gens und seiner Orthologe in den Genomen von Mensch und Zebrafisch.....	52
4.4	Das murine Lypd6-Protein	53
4.4.1	Vergleich des Lypd6-Proteins der Maus mit Lypd6-Proteinen anderer Spezies	53
4.4.2	Vergleich der Lypd6-Aminosäuresequenz mit anderen homologen Proteinen aus der Ly6-UPAR-Familie.....	54
4.5	Detailliertes Expressionsprofil des Lypd6-Gens in der Maus	56
4.5.1	Qualitativer Nachweis der Lypd6-Expression durch RT-PCR	56
4.5.2	<i>Northern-Blot</i> Analyse der Lypd6-Expression	57
4.5.3	Quantifizierung der Lypd6-Expression durch <i>Real-time</i> PCR.....	58
4.5.4	Histologischer Nachweis der Lypd6-Expression	59
4.5.4.1	Zeitverlauf der Expression im Mausembryo	59
4.5.4.2	Expression im adulten Maushirn	61
4.6	Überexpression von Lypd6 in Zelllinien und transgenen Mauslinien	63
4.6.1	Nachweis der transienten Überexpression in Neuro-2a und CHO-K1 Zellen	64
4.6.2	Herstellung von transgenen Mäusen mit Lypd6-Überexpression.....	65
4.6.3	Lypd6-Überexpression in den Synapsin-LYPD6 Mauslinien	66
4.6.3.1	Nachweis der Lypd6-HA-Expression durch RT-PCR	66
4.6.3.2	Histologischer Nachweis der Lypd6-Überexpression durch <i>in situ-</i> <i>Hybridisierung</i>	67
4.6.3.3	Quantifizierung der Lypd6-Überexpression durch <i>Real time</i> PCR	67
4.6.3.4	Nachweis des Lypd6 HA-Fusionsproteins in Lypd6-Transgenen.....	68
4.7	Verhaltensanalyse der transgenen Synapsin-Lypd6 Mauslinien.....	69
4.7.1	Allgemeine Charakterisierung	69
4.7.1.1	Allgemeiner Verhaltenstest nach Irwin	69
4.7.1.2	Lokomotorisches Verhalten im Offenfeld	69
4.7.1.3	Heimatkäfig-Aktivität	71
4.7.2	Aggressives Verhalten	71

4.7.3	Leistung des Arbeitsgedächtnisses.....	72
4.7.4	Angstverhalten	73
4.7.4.1	Aufsuchen des offenen Bereichs im Offenfeld	73
4.7.4.2	<i>Startle-Response</i>	74
4.7.5	Sensomotorisches <i>Gating</i>	74
4.7.6	Schmerzverhalten	74
4.7.6.1	Spinale Schmerzreaktion auf thermische Reize	74
4.7.6.2	Supraspinale Schmerzreaktion auf thermische Reize	75
4.7.6.3	Schmerzreaktion auf intestinale Reize	75
4.8	Verhaltenspharmakologische Analyse	76
4.8.1	Neurotransmittersystem Katecholamine	76
4.8.1.1	Ritalin-induzierte Hyperlokomotion.....	76
4.8.1.2	Amphetamin-induzierte Hyperlokomotion	77
4.8.2	Neurotransmittersystem Glutamat: Phencyclidin-induzierte Hyperlokomotion	78
4.8.3	Neurotransmittersystem Acetylcholin	79
4.8.3.1	Nikotin-induzierte Hypolokomotion.....	79
4.8.3.2	Nikotin-induzierte Analgesie im <i>Tail-flick</i> Test.....	80
4.8.3.3	Nikotin-induzierte Analgesie im <i>Hot plate</i> Test.....	81
4.8.3.4	Nikotin-induzierte Analgesie im <i>Writhing</i> Paradigma.....	81
4.9	Elektrophysiologie.....	82
4.10	siRNA vermittelte Reduktion des Lypd6-Transkriptes	84
4.10.1	<i>In vitro</i> -Validierung verschiedener siRNAs gegen Lypd6	84
4.11	siRNA-transgene Mauslinien.....	85
4.11.1	Validierung des Expressionreduktionskonstrukts in Zellkultur.....	86
4.11.2	Herstellung von transgenen Mäusen mit Lypd6-Expressionsreduktion.....	87
4.11.3	Reduktion der Lypd6-Expression in den sHP-Lypd6 Mauslinien.....	87
5.	DISKUSSION	89
5.1	Charakterisierung des Lypd6-Proteins.....	89
5.2	Genomische Organisation und chromosomale Lokalisierung	90
5.3	Detaillierte Analyse der Lypd6-Expression.....	91
5.4	Synapsin-Lypd6-transgene Mauslinien	92
5.4.1	Verhaltensanalyse.....	93

5.4.2	Pharmakologische und physiologische Analyse.....	95
5.5	Expressionsreduktion von Lypd6 in siRNA-Transgenen	99
5.6	Ausblicke.....	99
6.	ZUSAMMENFASSUNG	101
7.	LITERATURVERZEICHNIS	102
8.	ANHANG.....	112
8.1	Publikationsliste	112
8.2	Danksagung.....	113
8.3	Erklärung.....	113

1. Einleitung

1.1 Neuropeptide und Neuromodulation

Von Euler und Gaddum entdeckten 1931 mit Substanz P das erste Neuropeptid (von Euler and Gaddum, 1931). Der Begriff Neuropeptid wurde jedoch erstmals in den frühen 70er Jahren eingeführt, um endogene Peptide zu umschreiben, die in Nervenzellen synthetisiert werden und an der Funktion des Nervensystems beteiligt sind (de Wied, 1974). Neuropeptide sind Polypeptide mit einer Länge von 3 – 100 Aminosäuren, die in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen vorkommen und erfüllen zahlreiche verschiedene Funktionen. Als Neurotransmitter, Neuromodulatoren oder Neurohormone sind sie entscheidend an der Zellkommunikation von Nervenzellen beteiligt und vermitteln zudem auch trophische Effekte (Svensson et al., 2007).

Grundlegend für das Verständnis der Funktion von Neuropeptiden sind folgende Gesichtspunkte: (1) Neuroendokrine Zellen mit Peptidsekretion waren in der Evolution primitiver Nervensysteme schon sehr früh vertreten; (2) Neuropeptide sind phylogenetisch stark konserviert; (3) Peptide des Nervensystems können oft auch in peripherem Gewebe gefunden werden (Shepherd, 1994). Im Vergleich zu Neurotransmittern ist die Synthese von Neuropeptiden komplexer. Neurotransmitter werden oft an Synapsen zeitlich unmittelbar von zytosolischen Enzymen synthetisiert. Im Gegensatz dazu benötigt die Synthese von Neuropeptiden Genaktivierung, DNA-Transkription, RNA-Translation, ggf. posttranslationale Modifikationen und den Transport vom Soma zum Ort der Freisetzung. Neuropeptide haben zudem meist auch eine geringere Syntheserate als Neurotransmitter und liegen auch in geringeren Konzentrationen vor. In ihrer Funktion unterscheiden sie sich von Neurotransmittern vor allem dadurch, dass sie in erster Linie als Neuromodulatoren wirken und dadurch eine Verstärkung oder Abschwächung von Neurotransmitterwirkungen erzielen. Zur Identifizierung neuer Neuropeptide wurden in der Vergangenheit meist neuroaktive Fraktionen aus Gewebeextrakten isoliert und deren Funktion mit diversen biochemischen und zellbiologischen Methoden analysiert. Beispiele hierfür sind Bioassays, Radiorezeptor-Assays, Massenspektrometrie oder Verfahren die 'Orphan'-Rezeptoren verwenden (Siegel, 2006). Eine neuartige Möglichkeit zur Entdeckung neuer Neuropeptide wird in dem folgenden Abschnitt beschrieben.

1.2 Das 'RIKEN Mouse Gene Encyclopedia Project'

Mit der vollständigen Sequenzierung der Genome von Mensch und Maus und der freien Verfügbarkeit ihrer Sequenzen hat sich das Interesse der Genomforschung von der Sequenzierung auf die funktionelle Charakterisierung verschoben (Lander et al., 2001; Marshall, 2002; Venter et al., 2001; Waterston et al., 2002). Ein solcher Ansatz ist das '*RIKEN Mouse Gene Encyclopedia Project*' (Okazaki et al., 2002). Ziel dieses Projektes war die Identifizierung und Sequenzierung neuer Maus cDNAs. Dazu wurden zuerst aus 246 angereicherten cDNA-Bibliotheken 60770 cDNA Klone (FANTOM2 Datensatz) ausgewählt und in der letzten Erweiterung dieses Projekts (FANTOM3 Datensatz) 42031 neue cDNA Klone zu dem bisher bestehenden Datensatz hinzugefügt, so dass die FANTOM3-Datenbank nun 102801 vollständig sequenzierte cDNA-Sequenzen umfaßt (Maeda et al., 2006). Eine zusätzliche Erweiterung des '*RIKEN Mouse Gene Encyclopedia Project*' stellt die Verbindung der RIKEN cDNAs mit CAGE tags ('*Cap-analysis gene expression*') und GSC ditags ('*Gene signature cloning*') im FANTOM3 Datensatz dar (Carninci et al., 2005). Diese cDNAs wurden dann auf Sequenzhomologien hin analysiert und homologe Sequenzen zu Blöcken oder transkriptionellen Einheiten zusammengefasst. Für diese Blöcke wurde dann eine Sequenz als repräsentativ ausgewählt. Ein zweiter Aspekt des '*RIKEN Mouse Gene Encyclopedia Project*' waren die Annotierung und das *Mapping* der Gene des FANTOM3 Datensatzes. Zunächst wurden alle Sequenzen unter Verwendung automatisierter bioinformatischer Algorithmen annotiert und danach von einem internationalem Expertenkonsortium in einer 'Mouse Annotation Teleconference for RIKEN cDNA sequences' (MATRICS) noch einmal überprüft. So entstand ein umfassender Datensatz mit ausführlichen Struktur- und Sequenzinformationen, funktionalen Annotierungen und Informationen zur Gewebeherkunft von 102801 cDNA-Klonen. Von den 102801 cDNA-Klonen wurden 56722 als Protein-kodierende und 34030 als nicht-kodierende Sequenzen annotiert. Auf diese Weise konnte ein repräsentativer Transkript und Proteinsatz (RTPS) gebildet werden, der zurzeit den wohl umfassendsten Datensatz des Maustranskriptoms darstellt. Nimmt man zusätzlich zu den komplett durchsequenzierten cDNA-Klonen auch ESTs ('*Expressed sequence tag*') hinzu, erhöht sich die theoretische Anzahl transkriptioneller Einheiten im Mausgenom auf insgesamt ca. 90000.

Als Bestandteil des '*RIKEN Mouse Gene Encyclopedia Project*' wurden 62 cDNA-Bibliotheken aus 32 verschiedenen Strukturen des Nervensystems von adulten Mäusen und Mausembryonen synthetisiert. Aus diesen cDNA-Bibliotheken gingen 14877 vollständig sequenzierte cDNA-Klone in den FANTOM2 Datensatz ein und wurden in die Blöcke des murinen RTPS eingeordnet. Der RTPS wurde dann mit bioinformatischen Algorithmen nach Molekülen untersucht, die eine Funktion im Gehirn haben (Gustincich et al., 2003). Durch die Analyse dieses Datensatzes konnten neben 93 % aller schon bekannten Transkripte des

Nervensystems neue Maushomologe zu bekannten Transkripten, neue hypothetische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, neue Spannungs-gesteuerte Ionenkanäle und Connexine mit Funktion im Nervensystem gefunden werden. Zusätzlich wurde der RTPS auf neue sekretorische Proteine des Gehirns untersucht. Die Gesamtheit der sekretorischen Proteine im Extrazellulärraum des Nervensystems beinhaltet Neuropeptide, sowie Regulatoren und Effektoren der synaptischen Plastizität. Bislang wurden neuroaktive Fraktionen aus Hirnextrakten mit biochemischen Methoden aufgereinigt und getestet, jedoch sind endogene Liganden für eine große Fraktion neuronaler G-Protein-gekoppelten Rezeptoren immer noch nicht identifiziert (Civelli et al., 2001). Proteine mit solchen Eigenschaften sollten auch in dem RTPS des murinen Nervensystems identifiziert werden. Kanapin (Kanapin et al., 2003) und Grimmond (Grimmond et al., 2003) geben eine detaillierte Beschreibung für die Computergesteuerte Klassifizierung putativer löslicher Proteine, die über das endoplasmatische Retikulum in sekretorische Signalwege eingehen. In dem Ansatz von Gustincich et al. (2003) wurde der Maus RTPS auf cDNA-Klone hin untersucht, die kodierend für kurze Peptide (80 – 300 Aminosäuren) waren und über eine putative Signalpeptidsequenz gefolgt von einer Peptidase-Schnittstelle verfügten. Aus dieser Analyse resultierten 379 transkriptionelle Einheiten, die kodierend für potentielle Neuropeptide waren. Von diesen 379 waren 200 schon bekannte sezernierte Proteine und von den restlichen kodierten 90 für hypothetische neuartige Proteine. Eine sehr vielversprechende Möglichkeit zur Analyse der Funktion dieser 90 Gene ist die Herstellung von transgenen oder Knockout-Mäusen und die anschließende molekularbiologische, physiologische und verhaltensbiologische Analyse dieser Tiere. Diese 90 cDNA-Klone, die hypothetische Neuropeptide kodieren, bilden die Basis der vorliegenden Arbeit.

1.3 Gen-Überexpression und Herstellung von *Knockdown*-Mäusen

Zur funktionellen Charakterisierung von Genen, die im Zentralnervensystem exprimiert werden, ist es unabdingbar Modellsysteme zu schaffen, in denen die Auswirkungen von Überexpression und Expressionsreduktion in einem biologisch komplexen Zusammenhang untersucht werden können. Eine Möglichkeit hierzu ist die Herstellung von transgenen Mauslinien (Self, 2005). Als Technik zur Überexpression von Genen ist die Vorkerninjektion von DNA in befruchtete Eizellen zu einer Standardmethode geworden und wird schon seit ca. 30 Jahren erfolgreich eingesetzt. Transgene Mauslinien werden hierbei durch die direkte Mikroinjektion eines DNA-Fragments in befruchtete Eizellen und deren Retransfer in scheinschwangere Mäuse gewonnen. Das injizierte Fragment kann hierbei in verschiedene Segmente des Eizellengenoms integrieren, so daß aus der Injektion eines Fragmentes in verschiedene Eizellen transgene Mauslinien erzeugt werden können, die sich bedingt durch

Integrationsort und Integrationsanzahl im Grad der Überexpression unterscheiden. Ein DNA-Fragment für die Überexpression enthält in der Regel einen Promotor, ein Intron, den kodierenden Bereich des Gens oder seiner Mutante und ein Polyadenylierungssignal. Durch geeignete Wahl eines Gewebe- oder Zelltyp-spezifischen Promotors können auf diese Weise die Effekte der Überexpression auf einzelne Gewebe- oder Zelltypen analysiert werden. Eine spezielle Anwendung der Transgentechnik ist die Expression von sHP-RNA ('*small hairpin*-RNA'). Mit dieser Technik werden kurze RNA-Fragmente exprimiert, die eine doppelsträngige Haarnadelstruktur annehmen und sich funktionell wie siRNAs ('*small interfering RNAs*') verhalten (Elbashir et al., 2001; Gao and Zhang, 2007). So können transgene Tiermodelle mit verminderter Genexpression erzeugt werden (Hasuwa et al., 2002). Der große Vorteil im Vergleich zur Herstellung klassischer *knockout*-Tiermodelle ist der deutlich schnellere Ablauf dieser Technik (Glaser et al., 2005). Zum einen ist die Klonierung von genetischen Konstruktionen für die Injektion deutlich schneller als die Klonierung von Targetingvektoren für die Herstellung von *knockouts*, und zum anderen muss man bei der Pronukleusinjektion nicht das eher seltene Ereignis der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen abwarten. Ein Nachteil der Pronukleusinjektion liegt darin, dass durch die Zufälligkeit des Integrationsortes unerwünschte Effekte auf andere an diesem Ort gelegene Gene eintreten können. Daher ist es unabdingbar transgene Tiere aus verschiedenen Injektionen miteinander zu vergleichen.

1.4 Ziele der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war über die unter 1.2 genannten 90 cDNA-Klone außer ihrer hypothetischen Zugehörigkeit zum Sekretom des Gehirns nichts bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, aus diesen cDNA-Klonen anhand von Homologieanalysen und detaillierten Expressionsprofilen ein Kandidatengen auszuwählen und dessen Funktion *in vivo* durch die Erzeugung transgener Mauslinien und deren Analyse näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollten zunächst Mauslinien mit Überexpression und mit Expressionsreduktion des Kandidatengens erstellt werden. Für die Analyse eines möglichen Phänotyps wurden molekularbiologische, physiologische, pharmakologische und verhaltensbiologische Methoden eingesetzt.

2. Material

2.1 Geräte

ActiMot	ActiMot, TSE Systems
Analog-Digital-Wandler	ITC-18, Instrutech Corporation
Analysenwaage	BP 121 S, Sartorius
Aufsichtmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Bakterienschüttler	Innova 4200 Incubator shaker, New Brunswick Scientific
Begasungsbrutschrank	CB 210, Binder
Brennstrahl-Algesiometer	Analgesia Tail-Flick Apparatus, Columbus Instruments
CCD Kamera	KY-F75U, JVC
Dampfsterilisator	Varioklav 25T, H+P Labortechnik
Digitale Geldokumentation	Chemi Doc Syst CCIR, Bio-Rad Laboratories
Druckapplikationssystem	DAD-VC, ALA Scientific Instruments
Durchflusszytometer	FACS Calibur, BD
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories
Entwicklermaschine	X-OMAT 1000, Kodak
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss
Heizmagnetrührer	MR 3001 K, Heidolph, Fisher
Homogenisator	T8 ultra-turrax, IKA
Hybridisierungsinkubator	OV 5, Biometra
InfraMot	InfraMot, TSE Systems
Kryostat	CM 3050 S, Leica
Kühl-Thermo-Mixer	HLC Kühl-Thermo-Mixer, HLC
Mikromanipulator	Luigs und Neumann
Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories
Multiwellenphotometer	DYNEX Technologies
Neubauer-Zählkammer	Bright-Line, Hausser Scientific
PCR iCycler	iCycler, Bio-Rad Laboratories
pH-Meter	inoLab, WTW
Real-time PCR Gerät	Opticon DNA Engine, MJ Research
Reinraumwerkbank	HeraSafe KS15, Heraeus Instruments
Schüttler	Kombischüttler KL2, Edmund Bühler
Semi-dry Blotter	FastBlot B43, Biometra
Spektralphotometer	91-ND-1000 UV/Vis, Nanodrop
Startle-Response System	Startle-Response System, TSE Systems
Ultraschallhomogenisator	Sonoplus, Bandelin
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene
UV-Handlampe	UVM-57, Upland
Vakuumblotter	Basic Unit (1655003), Bio-Rad Laboratories
Vakuumpumpe	Bio-Rad Laboratories
Verstärker	Axopatch 200A, Axon Instruments
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Wärmeplatten-Algesiometer	1440 Analgesia Hot plate, Columbus Instruments
Y-Labyrinth	Werkstatt Uniklinikum Bonn
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus Instruments Biofuge pico, Heraeus Instruments Biofuge stratos, Heraeus Instruments Sorvall Evolution RC, Kendro

2.2 Objektträger

Für die *in situ*-Hybridisierungen wurden SuperFrost®Plus Objektträger von der Firma Menzel verwendet.

2.3 Software

Microsoft Office 2004	Microsoft Deutschland
Prism 4	GraphPad Software
Pulse	HEKA Elektronik
Vector NTI 7	Invitrogen

2.4 Reagenzien und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien stammen von den Firmen Invitrogen, Carl Roth, Merck oder Sigma-Aldrich.

2.5 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen und New England BioLabs bezogen.

2.6 Molekulargewichtsstandards

Molekulargewichtsstandards wurden als Längenmarker auf Agarosegelen und in *Southern*-Blots eingesetzt.

Tab. 2.1: Molekulargewichtsstandards

Molekulargewichtsstandard:	Fragmentgrößen [BP]:
DNA 100bp-Leiter (Invitrogen)	2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.
DNA 1kb-Leiter (Invitrogen)	12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506, 496, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75.
DNA-Marker II, DIG-gekoppelt (Roche Diagnostics)	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125.

2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die verwendeten Duplex Oligoribonukleotide wurden von der Firma Ambion bezogen. Als Ausnahme wurde das Duplex Oligoribonukleotid Stealth 770 von der Firma Invitrogen bezogen.

Tab. 2.2: Sequenzierprimer

Name	Sense + Antisense -	Sequenz 5' - 3'
LL 3.7 Seq. 1	+	AGACTTGTGGGAGAAGCTCGG
LL 3.7 Seq. 2	-	GCATGGCGGTAATACGGTTATCCA
Lypd6 Seq. 1	+	TCACCTGTGAGAAAGCAGCAGACA
Lypd6 Seq. 2	+	TGTGTTTCAGTGATCGTGTCCTGC
M13R(-20)-Primer	-	GCGGATAACAATTTACACAGG
SP6-Primer	+	ATTTAGGTGACACTATAG
Synapsin Promotor	+	ATTTAGTACCGCGGACAGAGCCTT
T3-Primer	+	GGAAACAGCTATGACCATG
T7-Primer	-	GTAATACGACTCACTATAGGGC

Tab. 2.3: DIG-Sondenprimer

Name	Sense + Antisense -	Sequenz 5' - 3'
Lypd6 DIG-Sonde	+	ATCTGCACCTCCTGCTGTGAA
Lypd6 DIG-Sonde	-	TTATAAGGTGAGTCCCAGCCA

Tab. 2.4: Klonierungsprimer

Name	Sense + Antisense -	Sequenz 5' - 3'
BGH polyA	+	GGTACCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTT
BGH polyA	-	CTAGAAGGCACAGTCGAGGC
Lypd6 HA	-	TTAAGCGTAATCAGGTACGTCGTAAGGGTATAAGG TGAGTCCCAGCCACA
Lypd6 Kozak	+	AGTGACACGCCAGTCTGC
Lypd6 OS	-	TAAGGTGAGTCCCAGCCACA
Lypd6R	-	TTATAAGGTGAGTCCCAGCCA
Lypd6 sHP	+	TGGGAACAGCATCTCTGTCAATCAAGAGATGACAG AGATGCTGTTCCCTTTTTTC
Lypd6 sHP	-	TCGAGAAAAAAGGGAACAGCATCTCTGTCACTCTCTT GAATGACAGAGATGCTGTTCCCA

Tab. 2.5: RT-PCR Primer

Name	Spezies	Sense + Antisense -	Position (Accession)	Sequenz 5' - 3'
1110017I16	Maus	+	98 (1110017I16Rik)	TGTCATCTCTCTTGGCCCTG
1110017I16	Maus	-	248 (1110017I16Rik)	CGCAGCCTCTGTCTGTTTTTC
1700015F17	Maus	+	117 (1700015F17Rik)	CCGTTTTCTCTCTGTAGCTCT
1700015F17	Maus	-	267 (1700015F17Rik)	TCTCGAGTACACACTGGACAT
1700029I15	Maus	+	177 (1700029I15Rik)	AACTGTTGCAGCCTCTCTCAG
1700029I15	Maus	-	327 (1700029I15Rik)	CAGGTTACATCATAGTAATA
1700058C13	Maus	+	713 (1700058C13Rik)	TCCATGTCCACTGAGGAAACC
1700058C13	Maus	-	865 (1700058C13Rik)	TTTCAGCAGCTTCACATCCAG
1700086D15	Maus	+	133 (1700086D15Rik)	GTGAGGACAGCCCTTTCCA
1700086D15	Maus	-	285 (1700086D15Rik)	CCTCAATGAGCATCTCAGCC
1810008K14	Maus	+	397 (1810008K14Rik)	ATTGCTGGCCTTTCCCTGTT
1810008K14	Maus	-	577 (1810008K14Rik)	CCAGGTGCTCCCCAAAAAAT
2310010M24	Maus	+	432 (2310010M24Rik)	TGTTTCAGTCCAAAGACGCCT
2310010M24	Maus	-	512 (2310010M24Rik)	TAGAATGTGGCAGAGGAGCA

(Fortsetzung auf nächster Seite)

Tab. 2.5 (Fortsetzung)

Name	Spezies	Sense + Antisense -	Position (Accession)	Sequenz 5' - 3'
2010004A03	Maus	+	928 (2010004A03Rik)	CTCATGGCCGTTGGTGTACA
2010004A03	Maus	-	1079 (2010004A03Rik)	CTTCCACGTGAGGGCCAAT
2900024P20	Maus	+	518 (2900024P20Rik)	CCCTGCCACATACAGAAAGAA
2900024P20	Maus	-	672 (2900024P20Rik)	CCTCACATTAGCCAGATGGAA
4921529N20	Maus	+	197 (4921529N20Rik)	TGTGCTCAAGAACGTGTGC
4921529N20	Maus	-	348 (4921529N20Rik)	AATTCTTTGGAGCTGCGG
4930444E23	Maus	+	562 (4930444E23Rik)	TTGAGAATCTCCCTGGGATTG
4930444E23	Maus	-	714 (4930444E23Rik)	GGAGGATGATGAGGGCATAG
4930470L04	Maus	+	122 (4930470L04Rik)	GGGACCGCATAGCTGTGTTAT
4930470L04	Maus	-	273 (4930470L04Rik)	CGTGTAACGGAAGCTCATGTG
4930474M22	Maus	+	135 (4930474M22Rik)	ACACAGCAAGCAGATGCCA
4930474M22	Maus	-	285 (4930474M22Rik)	TTCTCCTGGTCCCAAGTGC
4930504O13	Maus	+	83 (4930504O13Rik)	CTTGGTCTGTAGCCTCGCCT
4930504O13	Maus	-	233 (4930504O13Rik)	TGGACTGCACTCTCTCCCT
4930506F14	Maus	+	495 (4930506F14Rik)	TGGTTTGGCTTCAGTGCTGT
4930506F14	Maus	-	654 (4930506F14Rik)	TGCACCCGAAGTGAACATCT
4930525K10	Maus	+	140 (4930525K10Rik)	TCCTTGCTCTTCTACCCCAAG
4930525K10	Maus	-	292 (4930525K10Rik)	TGTTGAGGTCTGGAACGCA
4930527B16	Maus	+	613 (4930527B16Rik)	CCTCACTGCTACCGTTCTCC
4930527B16	Maus	-	764 (4930527B16Rik)	CCTGTGTTGGGTTTGCCTAG
4930569O18	Maus	+	455 (4930569O18Rik)	TATGGACAGCCCAACTGCAA
4930569O18	Maus	-	606 (4930569O18Rik)	GCCACGGTGTCAATCAATTTTC
4930597L12	Maus	+	248 (4930597L12Rik)	TTACCTTCTTCCCAGGCTC
4930597L12	Maus	-	400 (4930597L12Rik)	CCTATGCATCCAAGAGGGAGA
5430401F13	Maus	+	361 (5430401F13Rik)	GTCGCAGTGAAGTAAAGGCC
5430401F13	Maus	-	525 (5430401F13Rik)	TATCCTTCTGGCTTCTCTGGC
5430420P03	Maus	+	187 (5430420P03Rik)	GCTTCCCGTGTCAATTTCTGG
5430420P03	Maus	-	337 (5430420P03Rik)	CGAGGGATCTGAAGTACCACC
5430427O21	Maus	+	377 (5430427O21Rik)	CAACCGCAGATGTTACCCATT
5430427O21	Maus	-	535 (5430427O21Rik)	TTTAGTGCCTGCCTGACCAGA
5530400C23	Maus	+	13 (5530400C23Rik)	GAAAGTCCAGAGCCTCTTCCA
5530400C23	Maus	-	165 (5530400C23Rik)	AGTCCTGGGTTTTCTCTGCAG
6430562P08	Maus	+	1213 (6430562P08Rik)	CCACGGAGCTGGGATAGAGT
6430562P08	Maus	-	1363 (6430562P08Rik)	GGAGCAAAGAGCCAGGAAC
6530402D11	Maus	+	17 (6530402D11Rik)	CAGTGTCTCTGGGAGCTTTGA
6530402D11	Maus	-	169 (6530402D11Rik)	GGATGGAAGGCTGCTGTTTC
6720470G16	Maus	+	60 (6720470G16Rik)	CAAGGATGTCTTTAACGTGGG
6720470G16	Maus	-	210 (6720470G16Rik)	AACCTGCTGAAAGGGAAGC
9330119M13	Maus	+	266 (9330119M13Rik)	GCTCTTCTTGGCAGATATCCT
9330119M13	Maus	-	423 (9330119M13Rik)	AAAGCTAAGGAAGGCTGCTG
9330186K11	Maus	+	365 (9330186K11Rik)	GCCAAGTGTCCATCCTCAACA
9330186K11	Maus	-	517 (9330186K11Rik)	CGAAGGTAAGTGAACGCCT
A830006A04	Maus	+	149 (A830006A04Rik)	GCCTGGGTGTAAAGCGATCT
A830006A04	Maus	-	300 (A830006A04Rik)	CCGGAGGATCAACAGCAGTT
A930024F09	Maus	+	521 (A930024F09Rik)	TAGCGGCTTCGCAGGTATC
A930024F09	Maus	-	673 (A930024F09Rik)	AACCAGGACCGTGTCTTCC
B230311P14	Maus	+	198 (B230311P14Rik)	TGGGTGTTTCATTGTCCTACAG
B230311P14	Maus	-	351 (B230311P14Rik)	AGCAGTATTCCCAGGGTGTGA
B230316E19	Maus	+	180 (B230316E19Rik)	AAGGATTTTGACACTGAGGTG
B230316E19	Maus	-	330 (B230316E19Rik)	GCTGAGACAGTGAATATCAAA
B930017N20	Maus	+	289 (B930017N20Rik)	CACACAGGACGCTGCATGTC
B930017N20	Maus	-	439 (B930017N20Rik)	CCTCCCTCTTTAACCGCCA
TBP	Maus	+	696 (BC016476.1)	AAAGACCATTGCACTTCGTGC
TBP	Maus	-	796 (BC016476.1)	AAATCAACGCAGTTGTCCGTG
D130015I23	Maus	+	269 (D130015I23Rik)	CGAGTCTGACTGCGAACTGAG

(Fortsetzung auf nächster Seite)

Tab. 2.5 (Fortsetzung)

Name	Spezies	Sense + Antisense -	Position (Accession)	Sequenz 5' - 3'
D130015I23	Maus	-	419 (D130015I23Rik)	CGCTAATTCTTCATTGGTGCT
D130060C09	Maus	+	264 (D130060C09Rik)	TTGGAGAAGCGCAATTTCG
D130060C09	Maus	-	414 (D130060C09Rik)	TTGTAGCTTAACCTTGTCATCC
D930016B10	Maus	+	115 (D930016B10Rik)	ACCGGATTGGAACCGTCTT
D930016B10	Maus	-	266 (D930016B10Rik)	GGTGTTCGCGGAATTCTGGTA
D930031A20	Maus	+	460 (D930031A20Rik)	CTTGGAAGCTCCCGGAGTTT
D930031A20	Maus	-	610 (D930031A20Rik)	CCTGTTCTGTTGCCATGCT
D930048N14	Maus	+	523 (D930048N14Rik)	TCGCCTCACAACATGAACGA
D930048N14	Maus	-	690 (D930048N14Rik)	ACCACATGGCTTGCATGTCA
E130007J10	Maus	+	505 (E130007J10Rik)	GTTGCTGCCTTCCGTTTTGA
E130007J10	Maus	-	657 (E130007J10Rik)	GGTCCCGTGGATCACAAAAT
Lypd6	Maus	+	467 (E130115E03Rik)	CACCCTTCAACCACTCCGTA
Lypd6	Maus	-	617 (E130115E03Rik)	CTGTGACTTCCATCGTGTGCT
Lypd6q	Maus	+	554 (E130115E03Rik)	CCTGACATCTACTGTCCTCG
Lypd6q	Maus	-	706 (E130115E03Rik)	CTGTAGCCTTCGTGCTC

Tab. 2.6: Duplex Oligoribonukleotide (siRNAs)

Name	Gerichtet gegen:	Sequenz 5' - 3'
97792	Lypd6 (Maus)	GGGAACAGCAUCUCUGUCAtt UGACAGAGAUGCUGUUCCTg
97886	Lypd6 (Maus)	GGCUACAAGAUCUGCACCUtt AGGUGCAGAUUCUAGCCTt
97980	Lypd6 (Maus)	GGGAACUUUAGCUUAAAUUtt AAUUUAAGCUAAAGUUCCTg
Stealth 770	Lypd6 (Maus)	GCCACAUUUUGCUACCACAUCACCUA UAGGUGAUGUGGUAGCAAUUGUGGC
Luc	Firefly Luciferase	CGUACGCGGAUACUUCGA UCGAAGUAUCCGCGUACG

2.8 Kits

- BCATM Protein Assay Kit, Perbio
- DIG RNA Labeling Kit, Roche Diagnostics
- Immunpräzipitationskit, Invitrogen
- PureLinkTM HiPure Midi Plasmid Aufreinigungskit, Invitrogen
- PureLinkTM HQ Mini Plasmid Aufreinigungskit, Invitrogen
- PureLinkTM Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen
- PCR Aufreinigungskit, Qiagen
- PCR DIG Labeling Mix, Roche Diagnostics
- RNeasy Mini Kit, Nr.79654, Qiagen
- SYBR[®] Green JumpStartTM Taq ReadyMixTM, Sigma-Aldrich
- TOPO TA Cloning[®], Invitrogen
- Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning, Invitrogen

2.9 Antikörper und Antisera

Die folgenden Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Angegeben werden die Bezugsquellen und die verwendeten Verdünnungen.

Tab. 2.7: Verwendete Antikörper (Verdünnungen und Herkunft)

Antikörper	Beschreibung	Herkunft
Primärantikörper		
Anti-HA	Kaninchen-Antikörper gegen das virale Hämagglutinin (HA); Verdünnung bei Immunfluoreszenz: 1:200.	Sigma-Aldrich
Anti-HA	Kaninchen-Antikörper gegen das virale Hämagglutinin (HA); Verdünnung bei Western Blot: 1:500.	Abcam Ltd.
Anti-HA	Maus-Antikörper gegen das virale Hämagglutinin (HA); Verdünnung bei Immunpräzipitation: 1:1000.	Covance
Anti-DIG	Schaf-Antikörper gegen Digoxigenin (DIG). Alkalische Phosphatase-gekoppelt; Verdünnung 1:20000.	Roche Diagnostics
Anti-Kaninchen Cy3	Schaf anti Kaninchen IgG. Cy3-gekoppelt; rote Emission; Verdünnung 1:1000.	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen Alexa488	Schaf anti Kaninchen IgG. Alexa Fluor 488 - gekoppelt; grüne Emission; Verdünnung 1:500.	Dianova
Anti-Kaninchen HRP	Ziege anti Kaninchen IgG. <i>Horse Radish</i> Peroxidase (HRP)-gekoppelt; Verdünnung 1:10000.	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Anti-Maus HRP	Kaninchen anti Maus IgG. Horse Radish Peroxidase (HRP)-gekoppelt; Verdünnung 1:10000.	Sigma-Aldrich

2.10 *Escherichia coli*-Bakterienstämme

DH5α (Invitrogen) F⁻, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* und *tonA* (vermittelt Resistenz gegen den Phagen T1).

Stbl2 (Invitrogen) F⁻. *mcrA*, $\Delta(mcrBC-hsdRMS-mrr)$ *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *supE44*, *relA1* und $\Delta(lac-proAB)$.

TOP10 (Invitrogen) F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *recA1*, *araD139*, $\Delta(araleu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*, (Str^R), *endA1* und *nupG*.

Diese Stämme wurden für die Transformation von rekombinanten Plasmiden eingesetzt.

2.11 Plasmide

Tab. 2.8: Beschreibung und Herkunft aller verwendeten Plasmide

Vektor	Beschreibung	Erhalten von
L26 FSY(1.1)GW	MCS, Ap ^R ; Expressionsvektor (Synapsin1–Promotor).	H. Neumann
L26 FSY(1.1)GW Lypd6 HA BGH polyA	L26 FSY(1.1)GW mit einkloniertem Lypd6-HA und BGH polyA Fragment. Expression von Fusionsprotein Lypd6–HA in Neuronen mittels Synapsin1-Promotor.	Diese Arbeit
pLL3.7	MCS, Ap ^R , EGFP Reportergen; Vektor zur Expression von shRNA.	H. Neumann
pLL3.7 Lypd6	pLL3.7 mit einkloniertem Oligo α Lypd6. Expression von gegen Lypd6 gerichteter sHP–RNA mittels U6-Promotors.	Diese Arbeit
pCR®-Blunt II-TOPO®	LacZa, ccdB lethal, MCS, Kan ^R ; Klonier-, Sequenziervektor.	Invitrogen
pCR®-Blunt II-TOPO®-BGH polyA	pCR®-Blunt II-TOPO® mit einkloniertem ca. 300bp PCR–Fragment, hergestellt mit den Primern BGH polyA (+) und BGH polyA (-). Das Fragment entspricht dem bovinen Polyadenylierungssignal.	Diese Arbeit
pCR®-Blunt II-TOPO®-Lypd6 ORF	pCR®-Blunt II-TOPO® mit einkloniertem ca. 500bp PCR–Fragment, hergestellt mit den Primern Lypd6 Kozak und Lypd6R. Das Fragment entspricht dem offenen Leserahmen von Lypd6.	Diese Arbeit
pCR®-Blunt II-TOPO®-Lypd6 ORF OS	pCR®-Blunt II-TOPO® mit einkloniertem ca. 500bp PCR–Fragment, hergestellt mit den Primern Lypd6 Kozak und Lypd6OS. Das Fragment entspricht dem offenen Leserahmen von Lypd6 abzüglich des Stoppcodons.	Diese Arbeit
pCR®II-TOPO®	lacZa, MCS, Ap ^R , Kan ^R ; Klonier-, Sequenziervektor.	Invitrogen
pCR®II-TOPO® Lypd6 Sondenvorlage	pCR®II-TOPO® mit einkloniertem ca. 200bp PCR–Fragment, hergestellt mit den Primern Lypd6 DIG-Sonde (+) und Lypd6 DIG-Sonde (-). Vorlage für die in vitro–Transkription zur Herstellung DIG–markierter Ribosonden.	Diese Arbeit

(Fortsetzung auf nächster Seite)

Tab. 2.8 (Fortsetzung)

Vektor	Beschreibung	Erhalten von
pEF1/Myc-His	MCS, Ap ^R , Neo ^R ; Expressionsvektor (EF1 α -Promotor).	Invitrogen
pEF1 Lypd6 HA BGH polyA	pEF1/Myc-His mit einkloniertem Lypd6 HA und BGH polyA Fragment. Ubiquitäre Expression des Fusionsprotein Lypd6–HA mittels EF1 α -Promotors.	Diese Arbeit
pEGFP-N1	MCS, NeoR; Vektor zur Expression von N-terminalen eGFP–Fusionen (CMV–Promotor).	Clontech
pEGFP–N1 Lypd6 ORF	pEGFP N1 mit einkloniertem Lypd6 Fragment ohne Stoppcodon. Expression von Lypd6 fusioniert an den C–Terminus von EGFP mittels CMV–Promotor, mit Neomycin selektionierbar.	Diese Arbeit

2.12 DIG-markierte Sonden

Tab. 2.9: Beschreibung der verwendeten DIG–markierten PCR Sonden

Sonde	Verwendete Primer und Matrize	Verwendung	Blot
GAPDH-DIG	Zur Verfügung gestellt von D.-M. Otte	Analyse der GAPDH–Expression.	<i>Northern-Blot</i>
GFP-DIG	Zur Verfügung gestellt von D.-M. Otte	<i>Southern</i> -Genotypisierung nach Pronukleus-injektion in Oozyten mit dem PstI – EcoRV Fragment von pLL 3.7 sHP α Lypd6.	<i>Southern-Blot</i>
Lypd6 –DIG	„Lypd6 DIG-Sonde (+) und „Lypd6 DIG-Sonde (-)“ auf pCR®-Blunt II-TOPO®-Lypd6 ORF HA.	<i>Southern</i> -Genotypisierung nach Pronukleus-injektion in Oozyten mit dem PpuMI – XbaI Fragment von L26 FSy(1.1)GW Lypd6 HA BGH polyA. Analyse der Lypd6–Expression.	<i>Southern-Blot</i> <i>Northern-Blot</i>

Tab. 2.10: Beschreibung der verwendeten DIG–markierten Ribosonden

Sonde	Verwendete RNA - Polymerase und Matrize	Verwendung
Ribo Lypd6 DIG Sense	T7 RNA–Polymerase auf pCR®II-TOPO® Lypd6 Sondenvorlage.	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Ribo Lypd6 DIG Antisense	SP6 RNA–Polymerase auf pCR®II-TOPO® Lypd6 Sondenvorlage.	<i>In situ</i> -Hybridisierung

2.13 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 2.11: Beschreibung und Herkunft aller verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft/Referenz
CHO-K1	Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters <i>Cricetulus griseus</i> .	American Type Culture Collection (ATCC) Nummer: CCL-61.
CHO Lypd6 EGFP	CHO-K1 mit stabiler Integration von pEGFP-N1 Lypd6 ORF.	Diese Arbeit
CHO Lypd6 HA	CHO-K1 mit transienter Integration von pEF1 Lypd6 HA BGH polyA.	Diese Arbeit
Neuro-2a	Zelllinie aus Neuroblastomzellen aus einem spontanen Gehirntumor einer Stamm A Albino-Maus.	American Type Culture Collection (ATCC) Nummer: CCL-131.
Neuro-2a Lypd6 HA	Neuro-2a mit transienter Integration von L26 FSY(1.1)GW Lypd6 HA BGH polyA	Diese Arbeit

2.14 Mausstämme

In dieser Arbeit wurde der FVB/N (*inbred*) Mausstamm verwendet und von der Firma Charles River bezogen.

2.15 Zellkulturmedien

EMEM + 10 % FCS (v/v)

MEM (mit Earle's Salzen)	390 ml
Natrium-Pyruvat (100 mM Konzentrat)	5 ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung	5 ml
Nicht-essentielle Aminosäuren	50 ml
Fötales Kälberserum	50 ml

HAM's F12 (Coon's Modification) + 10 % FCS (v/v)

HAM's F12	445 ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung	5 ml
Fötales Kälberserum	50 ml

2.16 Nährmedien für die Kultivierung von *E.coli*

Alle Nährmedien wurden in Ultrapur dH₂O angesetzt.

Luria Bertani (LB)-Medium

Bactotrypton	1 % (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

Mit NaOH wurde der pH auf 7,5 eingestellt und das Medium autoklaviert.

Luria Bertani (LB)–1,5%iger Agar

Bactotrypton	1 % (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
Agar	1,5 % (w/v)

Mit NaOH wurde der pH auf 7,5 eingestellt und der Agar anschließend autoklaviert. Der LB-Agar wurde vor Gebrauch in der Mikrowelle verflüssigt und langsam auf 60 °C abgekühlt. Gegebenenfalls wurde nun ein Antibiotikum (30 µg/ml Kanamycin, 30 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Chloramphenicol) zugefügt und jeweils 20 ml in eine Petrischale gegossen, in welcher der Agar aushärtete.

2.17 Verwendete Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen in Ultrapur dH₂O angesetzt.

50x Dehnhardts-Lösung:

Ficoll	1 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	1 % (w/v)
Rinderserum–Albumin	1 % (w/v)

In DEPC–Wasser gelöst.

DEPC–Wasser: Zu 1 l Ultrapur dH₂O wurde 1 ml Diethylpyrocarbonat gegeben. Die Lösung wurde kräftig geschüttelt und über Nacht bei Dunkelheit inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung autoklaviert.

4'-6-Diamidino-2-phenylindol-(DAPI)-Stammlösung (50x):

DAPI(Roth)	50 µg/ml
------------	----------

Gelatinelösung:

Gelatine	1 % (w/v)
----------	-----------

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

1 M DTT: 3,09 g Dithiothreitol wurden in 20 ml 0,01 M Natriumacetat (pH 5,2) gelöst und dann steril filtriert.

4 % Paraformaldehyd (PFA)/PBS-CMF (w/v): 10 g PFA wurden in 250 ml 1x PBS-CMF auf 60 °C erhitzt und die Lösung mit 3 - 4 Tropfen 2 M NaOH geklärt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert und kalt verwendet.

1x Phosphat buffered saline Ca²⁺/Mg²⁺-frei (PBS-CMF), pH 7,4:

NaCl	140 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄	6,4 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Für Zellkulturexperimente wurde die Lösung vor Gebrauch autoklaviert.

TE, pH 8:

Tris-HCl	10 mM
EDTA	100 mM

Lösungen für indirekte ImmunfärbungenBlockierungslösung für indirekte Immunfärbungen:

Rinderserum–Albumin In 1x PBS-CMF.	1 % (w/v)
---------------------------------------	-----------

Permeabilisierungslösung:

Triton-X 100 In 1x PBS-CMF.	0,1 % (v/v)
--------------------------------	-------------

Waschlösung:

Rinderserum–Albumin In 1xPBS-CMF.	0,2 % (w/v)
--------------------------------------	-------------

Lösungen für DNA-Gelelektrophorese6x Probenpuffer:

Glycerol	50 % (v/v)
EDTA	0,002 mM
Bromphenol-Blau	0,0025 % (w/v)
Xylene-Cyanol	0,0025 % (w/v)

TAE-Gelelektrophoresepuffer:

EDTA	0,5 mM
Tris-Acetat	40 mM

Lösungen für RNA-Gelelektrophorese10x Formaldehyd (FA)-Puffer:

EDTA	10 mM
Natrium-Acetat	50 mM
MOPS	200 mM
In DEPC–Wasser und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.	

1x Formaldehyd (FA)-Gellaufpuffer:

10x Formaldehyd-Puffer	10 % (v/v)
Formaldehyd, 37 %	2 % (v/v)
In DEPC–Wasser.	

5x RNA Probenpuffer:

Bromphenol-Blau	0,0025 % (w/v)
EDTA	4 mM
Formaldehyd, 37 %	7,2 % (v/v)
Formamid	30,84 % (v/v)
10x Formaldehyd-Puffer	40 % (v/v)

Glycerol	20 % (v/v)
In DEPC–Wasser.	

Lösungen für *Northern*- und *Southern*–Blot

Depurinierungslösung:

HCL	250 mM
-----	--------

Denaturierungslösung:

NaOH	500 mM
NaCl	1,5 M

Neutralisierungslösung, pH 7:

Tris-HCl	500 mM
NaCl	1,5 M

Maleinsäurepuffer, pH 7,5:

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM

20x SSC-Puffer, pH 7:

NaCl	3 M
Natriumcitrat	300 mM

RNA-Hybridisierungspuffer für *Northern*-Blot:

Blocking-Reagenz	2 % (w/v)
Formamid	50 % (v/v)
20x SSC-Puffer	25 % (v/v)
N-Lauroyl-sarcosine	0,1 % (w/v)
SDS	0,02 % (w/v)

Standard-Hybridisierungspuffer für *Southern*–Blot:

Blocking-Reagenz	1 % (w/v)
20x SSC-Puffer	25 % (v/v)
N-Lauroyl-sarcosine	0,1 % (w/v)
SDS	0,02 % (w/v)

Waschpuffer 1:

20x SSC-Puffer	10 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)

Waschpuffer 2:

20x SSC-Puffer	1 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)

Stammlösung für Blockierung:

Blocking-Reagenz	10 % (w/v)
In Maleinsäure gelöst, autoklaviert und bei -20 °C gelagert.	

Blockierungslösung:

Stammlösung für Blockierung	10 % (v/v)
Maleinsäurepuffer	90 % (v/v)
Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert.	

Waschpuffer 3:

0,3 % Tween 20 in Maleinsäurepuffer.

Assaypuffer pH 9,5:

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
Mit NaOH auf pH 9,5 eingestellt.	
MgCl ₂	50 mM

Lösungen für *in situ*-Hybridisierung
Acetylierungspuffer:

Triethanolamin	100 mM
Essigsäureanhydrid	0,25 % (v/v)
Mit DEPC-Wasser ansetzen.	

20x SSC-Puffer, pH 7 (RNase-frei):

NaCl	3 M
Natriumcitrat	300 mM
In DEPC-Wasser.	

Prähybridisierungspuffer (RNase-frei):

Formamid	50 % (v/v)
20x SSC-Puffer (RNase-frei)	10 % (v/v)
In DEPC-Wasser.	

Hybridisierungspuffer (RNase-frei):

Formamid	40 % (v/v)
Dextransulfat	10 % (w/v)
20x SSC-Puffer (RNase-frei)	20 % (v/v)
1 M DTT	1 % (v/v)
50x Dehnhardts-Lösung	2 % (v/v)
Yeast t-RNA	0,1 % (w/v)
EDTA	2 mM

RNase A-Lösung:

NaCl	500 mM
Tris-HCl	10 mM
EDTA	0,25 mM

RNase A	0,002 % (w/v)
<u>Formamidwaschpuffer:</u>	
Formamid	50 % (v/v)
20x SSC-Puffer	10 % (v/v)
<u>Puffer 1:</u>	
NaCl	150 mM
Tris-HCl	100 mM
<u>Stammlösung für Blockierung:</u>	
Blocking-Reagenz	10 % /w/v)
Puffer 1	100 % (v/v)
Die Lösung wurde autoklaviert und bei -20 °C gelagert.	
<u>Blockierungslösung:</u>	
Stammlösung für Blockierung	20 % (v/v)
Puffer 1	79,9 % (v/v)
Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert.	
Triton-X 100	0,1 % (v/v)
<u>Antikörperlösung:</u>	
Stammlösung für Blockierung	10 % (v/v)
In Puffer 1 gelöst und durch einen Faltenfilter filtriert.	
Triton-X 100	0,1 % (v/v)
<u>Puffer 2:</u>	
NaCl	100 mM
Tris-HCl	100 mM
Mit NaOH auf pH 9,5 eingestellt.	
MgCl ₂	50 mM
<u>NBT-Lösung:</u>	
Dimethylformamid	70 % (v/v)
Nitro-Blau Tetrazolium Chlorid (NBT)	7,5 % (w/v)
Die Lösung wurde bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.	
<u>BCIP-Lösung:</u>	
5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat p-Toluidin Salz (BCIP)	5 % (w/v)
Dimethylformamid	100 % (v/v)
Die Lösung wurde bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.	
<u>Färbelösung:</u>	
BCIP-Lösung	0,35 % (v/v)
Levamisol	0,1 mM

NBT-Lösung	0,45 % (v/v)
Puffer 2	99,2 % (v/v)

Puffer 3:

EDTA	0,1 mM
Tris-HCl	10 mM

Lösungen für Protein-Gelelektrophorese und Western-Blot

12 %-Trenngelpuffer:

Tris-HCl, pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Acrylamid	12 % (w/v)
Bisacrylamid	0,24 % (w/v)
Ammonium-Persulfat	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

5 %-Sammelgelpuffer:

Tris-HCl, pH 6,8	187,5 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Acrylamid	5 % (w/v)
Bisacrylamid	0,1 % (w/v)
Ammonium-Persulfat	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

4x Protein-Probenpuffer:

Tris-HCl, pH 6,8	200 mM
SDS	8 % (w/v)
Glycerol	40 % (v/v)
Bromphenol-Blau	0,01 % (w/v)
1 M DTT	40 % (v/v)

Laemmli-Gelelektrophoresepuffer:

Tris-HCl	25 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Glycin	192 mM

Transferpuffer:

Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	10 % (v/v)

Ponceau-Färbelösung:

Essigsäure	5 % (v/v)
Ponceau-Rot	0,1 % (w/v)

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie-Blau	0,2 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	45 % (v/v)

Coomassie-Entfärbelösung:

Essigsäure	7,5 % (v/v)
Methanol	10 % (v/v)

Waschpuffer:

Tris-HCl	20 mM
NaCl	140 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Agarose-Gelelektrophorese, Ethidiumbromidfärbung, DNA-Fällung in Ethanol/Isopropanol, Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA sowie Transformation und Kultur von *E.coli* wurden nach den Vorschriften von Sambrook und Russel durchgeführt (Sambrook and Russell, 2001).

3.1.1 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller (New England BioLabs) angegebenen Bedingungen. Die Länge der entstandenen Restriktionsfragmente wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.1.2 Anlagerung von komplementären Oligonukleotiden

Zueinander komplementäre Oligonukleotide ('Sense und Antisense') wurden jeweils in Wasser resuspendiert und auf eine Konzentration von 60 pmol/µl eingestellt. Je 1 µl Sense- und 1 µl Antisense-Oligonukleotide wurden gemischt und in 48 µl Anlagerungspuffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-Kaliumhydroxid, pH 7,4; 2 mM Magnesiumacetat) in 4 Minuten bei 95 °C denaturiert und 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz langsam (0,1 °C pro Minute) auf 4 °C abgekühlt. Dieser Vorgang wurde im Thermocycler durchgeführt. Die Anlagerung der Oligonukleotide wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde zur Amplifikation oder *in vitro* Mutation von DNA-Sequenzen genutzt. Der Reaktionsansatz und das Temperaturschema der PCR-Reaktion wurden für jedes Experiment empirisch angepasst und optimiert. Maßgeblich für das Temperaturschema der PCR ist die *Annealing*-Temperatur der Primerpaare mit der DNA-Vorlage. Diese Temperatur wurde nach der folgenden vereinfachten Formel berechnet:

$$T_{\text{Annealing}} = 2x n_{\text{A+T}} + 4x n_{\text{G+C}} [^{\circ}\text{C}]$$

$n_{\text{A+T}}$: Anzahl von A- und T-Nukleotiden

$n_{\text{G+C}}$: Anzahl von G- und C-Nukleotiden

Bei Verwendung von Primerpaaren mit unterschiedlicher *Annealing*-Temperatur wurde die niedrigere Temperatur verwendet. Soweit nicht anders erwähnt, wurden PCR-Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 μl im Thermocycler durchgeführt (siehe Tab. 3.2).

Tab. 3.2: PCR-Reaktionsansatz

Komponente	Endkonzentration
DNA-Vorlage (cDNA, Plasmid-DNA)	2 ng/ μl
Primer <i>sense</i>	0,3 μM
Primer <i>antisense</i>	0,3 μM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase 10x Puffer	1x
MgCl_2	2 mM
dNTP-Mischung	25 nM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	1 U
mit dH_2O auf 50 μl auffüllen	

Das Standard-PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

Initiale Denaturierung	94 $^{\circ}\text{C}$	5 Minuten	
Denaturierung	94 $^{\circ}\text{C}$	45 Sekunden	} 30 Zyklen
<i>Annealing</i>	50 – 60 $^{\circ}\text{C}$	45 Sekunden	
DNA-Synthese	72 $^{\circ}\text{C}$	2 Minuten	
Terminale DNA-Synthese	72 $^{\circ}\text{C}$	10 Minuten	
Kühlung auf 4 $^{\circ}\text{C}$			

Die Länge der entstandenen PCR-Produkte wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

Für die Klonierung von Restriktionsfragmenten wurden Plasmide mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und danach die dabei entstandenen DNA-Überhänge der Plasmide dephosphoryliert. Ligationsansätze enthielten in einem Endvolumen von 20 μl (30 fmol) Plasmid-DNA, die 3 - 5fache Menge an einzuklonierendem Fragment, Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation kohäsiver Enden erfolgte für 2 Stunden im Wasserbad

bei 24 °C. Die Ligation glatter Enden erfolgte für 24 Stunden im Kühl-Thermo-Mixer bei 14 °C.

3.1.5 Ligation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem TOPO® TA und Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit von Invitrogen nach Anleitung des Herstellers ligiert.

3.1.6 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmidpräparation zu analytischen Zwecken wurden 4 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E.coli*-Klons eingesetzt. Die Isolation der Plasmide erfolgte über Spinsäulchen (Mini Kit, Invitrogen) gemäß Herstellerprotokoll.

Für die präparative Plasmidpräparation wurden 25 ml einer Übernachtskultur eingesetzt. Die Isolation der Plasmide erfolgte über Kieselgelsäulen (Midi Kit, Invitrogen) gemäß Herstellerangaben.

3.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgeschnitten. Die weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 30 µl TE-Puffer. Die Eluate wurden bei -20 °C gelagert.

3.1.8 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien wurden ca. 0,5 cm lange Stücke von Mausschwänzen über Nacht bei 55 °C auf einem Kühl-Thermo-Mixer in einer Proteinase K-Lösung geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Ansätze bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit der genomischen DNA wurde abgenommen und mit einem gleichen Volumenteil Isopropanol gemischt. Die dabei als Faden ausfallende genomische DNA wurde mit einer Pipettenspitze gefischt und in 70%igen Ethanol überführt und bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei 50 °C für 10 Minuten getrocknet. Dann konnte das DNA-Pellet in der gewünschten Menge Puffer aufgenommen werden.

3.1.9 Southern-Blot

Für den *Southern*-Blot wurden DIG-markierte genspezifische Sonden durch PCR mit DIG-markierten Nukleotiden (Roche Diagnostics) hergestellt.

Tab. 3.3: Reaktionsansatz für die Herstellung der Sonde

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA 100 ng	x µl
Primer sense 20 µM	2 µl
Primer antisense 20 µM	2 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase 10x Puffer	5 µl
MgCl ₂ 2mM	4 µl
10x PCR DIG Probe Labeling Mix (Roche)	5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase 1 U	1 µl
mit dH ₂ O auf 50 µl auffüllen	

Die Sonden wurden mit dem PCR-Aufreinigungskit von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt. Genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde über Nacht mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten und danach elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden dann durch 10minütige Inkubation des Gels in einer 0,25 N HCl-Lösung depuriniert. Anschließend wurde die DNA durch 30minütige Inkubation des Gels in der alkalischen Denaturierungslösung denaturiert. Danach wurde das Gel mit dH₂O gespült, 30 Minuten in Neutralisationslösung neutralisiert und 5 Minuten in 10x SSC inkubiert. Nun wurde ein mit 10x SSC getränktes Whatmanpapier zusammen mit einer Nylon-Membran luftblasenfrei auf den Boden des Vakuumblotgerätes geschichtet und das Gel vorsichtig auf die Nylon-Membran platziert und mit 1 l 10x SSC-Puffer überschichtet. Mittels eines angelegten Vakuums wurde ein Unterdruck (5 bar) erzeugt und die DNA-Fragmente in 90 Minuten auf eine Nylon-Membran transferiert. Nach dem Abbau des Blots wurden die DNA-Fragmente durch UV-Bestrahlung kovalent an die Nylonmembran gebunden. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsflasche überführt und bei 68 °C in 10 ml Hybridisierungslösung mit 100 µg/ml gescherter und denaturierter Heringssperma-DNA für 1,5 Stunden im Hybridisierungsinkubator prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit der denaturierten DIG-Sonde (End-Konzentration: 20 ng/ml Hybridisierungslösung) bei 68 °C über Nacht. Im Anschluß daran wurde die Membran 3x für 10 Minuten bei RT mit Waschlösung 1 und 3x 10 Minuten bei 68 °C mit Waschlösung 2 gewaschen. Dann wurde die Membran 5 Minuten mit Maleinsäurepuffer gespült. Durch 60minütige Inkubation in Blockierungspuffer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Nach diesem Schritt wurden 1,5 µl Anti-DIG-AP-Lösung dazu pipettiert

und der Blot für 40 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten mit Waschpuffer 3 entfernt. Dann wurde die Membran 5 Minuten lang im Assaypuffer äquilibriert. Im Anschluss daran wurde CDP-Star-Lösung (1:100 verdünnt mit Assaypuffer) auf die Membran gegeben und diese 5 Minuten vorsichtig geschwenkt. Danach wurde die Membran abgetropft und luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Überschüssige Lösung wurde nun gründlich entfernt. Im Dunkeln wurde in einer Filmkassette ein Röntgenfilm (GE Healthcare) auf die Membran gelegt und je nach Intensität der Signale für 30 – 60 Minuten belichtet. Der Film wurde dann mit einer automatisierten Entwicklermaschine entwickelt.

3.1.10 Isolierung von RNA

Für die Isolierung und die weitere Analyse von RNA wurden stets Handschuhe getragen und alle Schritte auf Eis ausgeführt. Für alle Puffer und Lösungen wurde ausschließlich DEPC-behandeltes H₂O verwendet. Pipettenspitzen und Pipetten wurden nur für Arbeiten mit RNA eingesetzt. Glaswaren wurden vor Gebrauch mindestens 4 Stunden bei 180 °C gebacken. Metallteile wie Spatel, Pinzetten oder Homogenisatoren wurden nach dem Sterilisieren gründlich mit RNase-Off und DEPC-behandeltem H₂O gewaschen.

Die RNA wurde mit dem TRIzol-Reagenz von Invitrogen isoliert. Dabei wurden 100 mg Gewebe oder 5×10^6 Zellen jeweils mit 1,6 ml TRIzol-Reagenz behandelt. Das Gewebe wurde im TRIzol-Reagenz mit einem Homogenisator zerkleinert und durch 5maliges Aufziehen durch eine 21 G-Nadel zusätzlich homogenisiert. Zellen wurden durch 10maliges Aufziehen durch eine 21 G-Nadel homogenisiert. Die Homogenisate wurden bei 4 °C mit 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand 5 Minuten bei RT inkubiert und mit 1/10 Volumen 1-Bromo-3-chloro-propan durch Vortexen 1 Minute lang durchmischt. Das Gemisch wurde bei RT 3 Minuten inkubiert und dann bei 4 °C mit 11400 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit einem Volumen Isopropanol gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde die Probe bei 4 °C mit 11400 rpm abzentrifugiert und das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann 15 Minuten bei 55 °C getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen.

3.1.11 RNA-Elektrophorese

Zur Qualitätsüberprüfung oder für *Northern*-Blot-Analysen von isolierter RNA wurden denaturierende Formaldehydgele verwendet. Für ein 1,2%iges Formaldehyd-Agarosegel wurden 0,6 g RNase-freie Agarose in 45 ml DEPC Wasser und 5 ml 10x FA-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Auf einer Heizrührplatte wurde die Agaroselösung dann

unter Rühren langsam auf 60 °C abgekühlt. Danach wurden 900 µl Formaldehyd 37 % und 1 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) hinzugefügt und das Gel in dem Gelträger unter dem Abzug gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in die Gelkammer gelegt und mit 1x FA-Gellaufpuffer überschichtet.

Es wurden 10 µg der isolierten RNA und 5 µl des Digoxigenin-markierten Molekulargewichtsstandards mit 4 µl 5x RNA Probenpuffer gemischt und mit DEPC-Wasser auf 20 µl ergänzt. Die Probe wurde für 3 Minuten auf 65 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach 10 Minuten Vorlauf des Gels bei 70 V fand die elektrophoretische Trennung der RNA bei einer konstanten Spannung von 70 V über 2 Stunden statt. Die Qualität der RNA und die Auftrennung konnten unter UV-Licht anhand der ribosomalen RNAs beurteilt werden.

3.1.12 Northern-Blot

Wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben wurden DIG-markierte PCR Sonden für den *Northern-Blot* hergestellt und aufgereinigt. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurde das Gel 3x 10 Minuten in DEPC-Wasser gewaschen und dann 20 Minuten in 0,05 M DEPC-NaOH inkubiert. Darauf wurde das Gel für 30 Minuten in 10x SSC-Puffer inkubiert. Die RNA wurde dann mittels Vakkumblotverfahren auf eine Nylonmembran transferiert (siehe 3.1.9). Danach wurde die RNA durch UV-Bestrahlung kovalent an die feuchte Nylon-Membran gebunden. Die Membran wurde dann bei 68 °C in einer Hybridisierungsflasche in 10 ml Hybridisierungslösung mit 100 µg/ml gescherter und denaturierter Heringssperma-DNA für 1,5 Stunden im Hybridisierungsinkubator prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit der denaturierten DIG-Sonde (End-Konzentration: 40 ng/ml Hybridisierungslösung) bei 68 °C über Nacht. Im Anschluß daran wurde die Membran zweimal kurz in Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und darauf für 3x 10 Minuten bei 68 °C in Waschlösung 2 gewaschen.

Der immunologische Digoxigenin-Nachweis wurde wie bereits unter 3.1.9 beschrieben durchgeführt.

3.1.13 In situ-Hybridisierung

Für die *in situ*-Hybridisierung (ISH) wurden DIG-markierte cRNA-Sonden durch *in vitro* Transkription von klonierten cDNAs mit DIG-markierten Nukleotiden (Roche Diagnostics) hergestellt. Hierzu wurden die cDNA-Vektoren linearisiert, durch Phenol-Chloroform-Extraktion und DNA-Fällung aufgereinigt, in DEPC-Wasser aufgenommen und für die *in vitro* Transkription wie folgt als Vorlage verwendet.

Tab. 3.1: *In vitro*-Transkriptionsansatz

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA 1 µg + DEPC-H ₂ O	13 µl
10x DIG dNTP Labeling Mix	2 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
RNase-Inhibitor (30 U/µl)	1 µl
RNA-Polymerase	2 µl

Die Reaktion wurde 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurden 3 µl RNase-freie *DNase I* (30 U/µl) zugegeben und der Ansatz 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der *DNase*-Verdau wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (RNase-frei) beendet und der Ansatz mit DEPC-Wasser auf 40 µl Volumen aufgefüllt. Es wurden 5 µl 4 M LiCl und 135 µl Ethanol dazugemischt und der Ansatz 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Dann wurde die Lösung 20 Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 80 % DEPC-Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 5 Minuten in 87,5 µl DEPC-Wasser gelöst, mit 12,5 µl LiCl und 250 µl Ethanol gemischt und 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Erneut wurde die Lösung 20 Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 80 % DEPC-Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 10 Minuten bei 55 °C getrocknet und 5 Minuten in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. Die hergestellten Sonden wurden unmittelbar für ISH verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung der Schnittpräparate wurden die Organe sofort nach der Entnahme in kaltem Isopentan eingefroren und bei -80 °C gelagert. Im Kryostaten wurden dann 12 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte bei 42 °C für 1 Minute getrocknet, und dann bei -80 °C gelagert. Die Schnittpräparate wurden vor der Verwendung 5 Minuten bei 42 °C getrocknet, mit einem Fettstift umrandet und erneut 5 Minuten getrocknet. Dann erfolgte die Prähybridisierung in gebackenen Glasküvetten. In eiskaltem 4 % Paraformaldehyd (in DEPC-PBS) wurden die Präparate 30 Minuten fixiert und danach 2x 5 Minuten in DEPC-PBS gewaschen. Unter Rühren wurden die Schnitte 2x 5 Minuten in Acetylierungspuffer inkubiert und wieder 2x 5 Minuten in DEPC-PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Objektträger 50 Minuten bei 37 °C in Prähybridisierungspuffer inkubiert.

Danach erfolgte die Hybridisierung mit der denaturierten DIG-cRNA-Sonde (End-Konzentration: 200 ng/ml Hybridisierungslösung) in 500 µl Hybridisierungslösung mit 100 µg/ml gescherter und denaturierter Heringssperma-DNA bei 57 °C über Nacht in einer mit Prähybridisierungspuffer angefeuchteten Hybridisierungskammer. Die Objektträger wurden mit Parafilm abgedeckt, um die Schnitte gleichmäßig mit Hybridisierungslösung zu benetzen und vor Austrocknung zu schützen. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 10 Minuten in einer Glasküvette mit 2x SSC inkubiert und der Parafilm entfernt. Danach erfolgte 30

Minuten bei 37 °C unter Rühren ein RNase A-Verdau. Die RNase A-Lösung wurde durch Formamidwaschpuffer ersetzt und die Schnitte 2x 15 Minuten bei 55 °C im schüttelnden Wasserbad gewaschen. Danach wurden die Präparate 2x 15 Minuten bei 55 °C im schüttelnden Wasserbad mit 1x SSC und 2x 15 Minuten in 0,1x SSC gewaschen.

Für die immunologische Detektion wurden die Präparate 2x 10 Minuten in Puffer 1 bei RT geschüttelt und dann in einer mit Wasser angefeuchteten Kammer mit Blockierungslösung bedeckt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Blockierungslösung wurde vorsichtig abgesaugt und durch Antikörperlösung mit Anti-DIG-AP ersetzt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Objektträger in einer Glasküvette 2x 10 Minuten mit Puffer 1 geschüttelt und 10 Minuten in Puffer 2 äquilibriert. Der Puffer wurde vorsichtig abgesaugt und 500 µl Färbelösung auf die Objektträger gegeben. Die Farbreaktion erfolgte 2 – 24 Stunden bei Dunkelheit in der feuchten Kammer. Nach der Färbung wurde die Reaktion durch eine Inkubation von 2 Minuten in Puffer 3 gestoppt und die Präparate nach kurzem Eintauchen in Wasser in Aquatex eingedeckelt. Die hybridisierten Schnitte wurden lichtmikroskopisch analysiert und mit der im Mikroskopie-System integrierten digitalen Kamera dokumentiert.

3.1.14 Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis von Transkripten in Zell- oder Organ-typischen RNA-Präparationen wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (siehe 3.1.17) und diese cDNA dann als Vorlage in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die PCR erfolgte nach demselben Schema wie in 3.1.3 beschrieben. Als DNA-Vorlage wurde pro Probe ein Mastermix aus cDNA verwendet, der aus 3 unabhängigen RNA-Präparationen pro Probe erstellt wurde. Alle für die RT-PCR verwendeten Primer waren Intron-überspannend. So dass im Fall einer genomischen Kontamination der cDNA-Proben unter den oben genannten PCR-Bedingungen keine zusätzlichen auf der Kontamination beruhenden PCR-Produkte entstehen können.

3.1.15 Real-time PCR

Die Expression einiger ausgewählter Transkripte wurde mithilfe von *Real Time* PCR in einer Opticon DNA Engine quantifiziert. Als DNA-Vorlage wurden jeweils Zell- oder Organ-typische cDNA-Präparationen verwendet. Für diese PCR wurde das SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ von Sigma-Aldrich entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. Die Konzentrationen von Primern und Magnesium wurden für jedes Primerpaar mit Vorversuchen optimiert. Die Spezifität der PCR Bedingungen wurde durch die Ermittlung der Schmelztemperaturen der betreffenden zu amplifizierenden DNA-Fragmente gesichert. Von

diesen wurde zuvor in Agarose-Gel-Analysen gezeigt, dass sie mit der erwarteten Produktgröße korrelieren. Eine relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte durch Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode unter Verwendung von TBP (*TATA Binding Protein*) als Referenzgen und der Expression in der Niere als Kalibrator (Livak and Schmittgen, 2001). Die PCRs wurden als Triplikate durchgeführt und aus statistischen Gründen mehrmals mit unabhängigen Proben wiederholt, d. h. pro Experiment (*Real-time PCR*) wurde cDNA aus 5 unabhängigen RNA-Präparationen eingesetzt.

3.1.16 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmiden wurden von der Firma Macrogen in Seoul (Korea) durchgeführt.

3.1.17 Reverse Transkription

Die für die cDNA-Synthese eingesetzte RNA wurde zunächst einer *DNase I*-Behandlung (Applera) unterzogen. Für jeweils 5 µg Gesamt-RNA wurden 30 U *DNase I* und die entsprechende Menge Puffer eingesetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend, nach Zugabe von 1 µl *DNase Stopp-Solution* (Applera), bei 65 °C für 10 Minuten inkubiert.

Zur Generierung von cDNA wurden das „Superscript II First-Strand Synthesis“ System für RT-PCR von Invitrogen nach Anleitung der Hersteller eingesetzt. Die cDNA wurde mittels „Oligo-(dT)-Priming“ synthetisiert.

3.1.18 Isolierung von Proteinen aus Geweben

600 mg Gewebe wurden in einer 0,32 M Sucrose-Lösung unter Anwesenheit des Complete Mini Protease Inhibitor Cocktails (Roche Diagnostics) 3x 20 Sekunden lang mit einem Homogenisator zerkleinert und dann mit einem Ultraschallhomogenisator 30 Sekunden über 5 Zyklen bei einer Leistung von 10 % behandelt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis wurde das Homogenisat 30 Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (intra- und extrazelluläre Proteine) wurde abgenommen und eingefroren. Das Pellet wurde in 1000 µl einer 2%igen SDS-Lösung aufgenommen und mit einem Ultraschallhomogenisator 30 Sekunden über 5 Zyklen bei einer Leistung von 10 % behandelt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis wurde das gelöste Pellet 30 Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Membranproteine) wurde abgenommen und eingefroren.

3.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.2.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt einer Probe wurde mit Hilfe des BCA™ Protein-Assays (Perbio) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines Multiwellenphotometers bestimmt.

3.2.2 Immunfärbung von Säugerzellen

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Dazu wurden die Deckgläschen zuvor für 30 Minuten mit einer 0,1%igen Gelatinelösung beschichtet. Zwei Tage vor der Immunfärbung wurden ca. 5×10^4 Zellen auf den Deckgläsern ausgesät und bei normalen Kulturbedingungen gehalten. Am Färbetag wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS-CMF gewaschen und mit 4 % PFA/PBS-CMF für 25 Minuten bei RT fixiert. Die Zellen wurden dann durch eine Inkubation mit 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS-CMF für 10 Minuten permeabilisiert. Die Deckgläschen wurden aus den Schalen entnommen, in einer feuchten Kammer auf Parafilm gelegt und mit Blockierungslösung für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde bei RT mit dem Primärantikörper inkubiert. Danach wurden die Zellen zunächst 3x für 5 Minuten mit Waschlösung gewaschen, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei RT mit dem Sekundärantikörper. Dann wurden die Deckgläschen 3x 5 Minuten mit Waschlösung gespült und anschließend zur Darstellung der Zellkerne eine DAPI-Färbung (siehe 3.3.9) angeschlossen. Darauf wurden die Zellen in Fluoromount (Serva) eingebettet und mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

3.2.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem Immunpräzipitationskit von Invitrogen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen.

3.2.4 Protein-Gelelektrophorese und Western-Blot

Für die Protein-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurde das Mini-Protean® 3 Cell System (Bio-Rad) verwendet. Sämtliche Glaswaren wurden vorher mit Wasser gespült und mit Aceton gereinigt. Erst wurde ein 12 % Polyacrylamid-Trenngel gegossen und mit 1-Butanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das 1-Butanol mit Whatmanpapier abgesaugt und ein 5 % Polyacrylamid-Sammelgel darüber gegossen. Die Proteinproben

wurden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und bei einer Spannung von 90 V über einen Zeitraum von 2 Stunden elektrophoretisch getrennt. Zur Kontrolle der Proteingrößen lief immer ein Proteinstandard mit.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 3 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Das Trenngel wurde auf eine Nitrocellulosemembran gelegt und zwischen je drei Lagen mit Transferpuffer angefeuchtetes Whatmanpapier in der Semi-dry Blot-Apparatur (Fastblot B43, Biometra) deponiert. Der Proteintransfer erfolgte 30 Minuten bei einem konstanten Strom von 3,5 mA pro cm² der Gelfläche. Danach wurde die Membran 5 Minuten in PBS-CMF gewaschen und dann 5 Minuten in Ponceau-Färbelösung inkubiert. Dann wurde die Membran solange in PBS-CMF gewaschen, bis die Ponceau-Färbung verschwand und dann für die immunologische Detektion weiterverwendet.

Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindestellen wurde die Membran für 1 Stunde bei RT in 1x Rotiblock (Carl Roth) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in 1x Rotiblock. Am nächsten Tag wurde die Membran 4x 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen und dann 3 Stunden mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper ('Horseradish Peroxidase' = HRP) bei 4°C in 1x Rotiblock inkubiert. Die Membran wurde erneut 4x 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Membran für 5 Minuten mit 1,5 ml ECL-Entwicklerlösung (Perbio) inkubiert. Danach wurde die Membran abgetropft und feucht, luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Überschüssige Lösung wurde nun gründlich entfernt. Im Dunkeln wurde in einer Filmkassette ein Röntgenfilm (GE Healthcare) auf die Membran gelegt und je nach Intensität der Signale für 1 – 5 Minuten belichtet. Der Film wurde dann mit einer automatisierten Entwicklermaschine entwickelt.

3.3 Zellkultur-Methoden

3.3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden gewöhnlich in Gewebekulturschalen von 6, 10 oder 15 cm Durchmesser kultiviert. Ihr Nährmedium wurde zweimal wöchentlich erneuert. Die Gefahr von bakteriellen Infektionen wurde durch Zugabe von Penicillin und Streptomycin zum Medium minimiert. Neuro-2a-Zellen wurden in EMEM + 10 % FCS und CHO-K1-Zellen in HAM's F12 + 10 % FCS kultiviert.

3.3.2 Passage von Säugerzellen

Zur Passage von nahezu konfluent gewachsenen Zellen wurde erst das Medium vollständig von den Zellen entfernt, dann die Zellen mit 1x PBS-CMF gewaschen und durch eine 3-minütige Inkubation bei 37 °C in einer Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) vom Untergrund abgelöst. Danach wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert und die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren dissoziiert. Die Zellen wurden in ein Falcon-Gefäß überführt, durch Zentrifugation (1000 rpm, 4 Minuten) pelletiert, in Medium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung ausgesät.

3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl pro ml errechnete sich hierbei aus der Zahl der Zellen in den 4 Großquadraten, multipliziert mit dem Kammerfaktor. Dieser ergibt sich aus dem Volumen der Zählkammer und beträgt bei der in dieser Arbeit verwendeten Zählkammer $2,5 \times 10^3$.

3.3.4 Einfrieren und Lagerung von adhärenenten eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden $5 - 6 \times 10^6$ Zellen wie unter 3.3.2 beschrieben von der Kulturschale gelöst, dissoziiert und pelletiert. Das Pellet wurde dann in 1,5 ml Medium mit 10 % Dimethylsulfoxid resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden möglichst schonend eingefroren, indem sie zunächst über Nacht bei -80 °C und anschließend in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert wurden (-196 °C).

3.3.5 Auftauen von Zellen

Der Auftauvorgang wurde möglichst zügig durchgeführt, um die toxische Wirkung des Dimethylsulfoxids zu minimieren. Dazu wurden die Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut, mit Nährmedium versetzt und durch 4-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert, je nach gewünschter Zelldichte ausgesät und bei Standardbedingungen kultiviert.

3.3.6 Mycoplasmen-Test

Mycoplasmen sind die kleinsten bekannten Prokaryoten. Sie besitzen keine Zellwände und parasitieren häufig auf der Plasmamembran tierischer Zellen. Kontaminationen mit Mycoplasmen stellen eine stetige Gefahr in der Zellkultur dar, weil sie wegen ihrer Flexibilität

und geringen Größe (100 – 250 nm) Sterilfilter mit einer nominellen Porengröße von 0,2 µm passieren können. Eine Mycoplasmen-Kontamination macht sich häufig durch hohen Arginin-Verbrauch und schlechtes Zellwachstum bemerkbar. Zum Nachweis von Mycoplasmen wurden die Überstände der verwendeten Zellkulturen mittels PCR auf das Vorhandensein von Mycoplasmen-DNA analysiert

3.3.7 DAPI-Färbung

Durch die Bindung von DAPI an AT-Blöcke in der kleinen Furche von doppelsträngiger DNA können Zellkerne auf einfache Weise gefärbt werden (Kubista et al., 1987). Dazu wurde erst das Medium von auf Deckgläschen gewachsenen Zellen entfernt und diese dann mit 1x PBS-CMF gewaschen. Aus 50x DAPI-Stammlösung und 1x PBS-CMF wurde eine 1x DAPI-Färbelösung hergestellt und die Zellen bei 37 °C für 15 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Dann wurde die Färbelösung abgegoßen und die Zellen eingedeckelt.

3.3.8 Transfektion von somatischen Zellen mit Plasmiden

Die Transfektion von somatischen Zellen mit Plasmiden erfolgte durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* von Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 3 µg zirkuläre Plasmid-DNA zur Transfektion von 5×10^4 Zellen eingesetzt.

3.3.9 Transfektion von somatischen Zellen mit siRNA

Die Transfektion von somatischen Zellen mit siRNA erfolgte durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* von Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 20 pmol siRNA zur Transfektion von 5×10^4 Zellen eingesetzt.

3.3.10 Selektion von transgenen Zellen

Die verwendeten Vektoren für die Genexpression enthielten zusätzlich ein Gen (Neo) zur Expression der Neomycin Phosphotransferase. Dieses Enzym vermittelt eine Resistenz gegen die Antibiotika Neomycin und G418. Nach erfolgter Transfektion der Zellen wurden diese in einer Zelldichte von ca. 10^5 -Zellen pro 10 ml Kulturschale ausgesät und am darauffolgenden Tag in Medium mit 0,4 mg/ml G418™ (Invitrogen) Antibiotika-Konzentration für etwa 14 Tage kultiviert.

3.3.11 Klonierung von somatischen Zellen

Nach ca. 2-wöchiger Selektion wurden die transfizierten Zellen 2x mit 1x PBS-CMF gewaschen und dann mit 1x PBS-CMF überschichtet. Darauf wurden die Zellen mit Hilfe einer 200 µl-Eppendorf-Pipette unter mikroskopischer Sicht mechanisch vom Untergrund gelöst und in einem Volumen von 30 µl abgesogen. Die Zellen wurden in ein Loch einer 96-Lochplatte überführt, welches 30 µl Trypsinlösung enthielt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank sind die Zellen mit 100 µl des entsprechenden Kulturmediums versetzt, dissoziiert und in ein mit 1 ml Medium gefülltes Loch einer 24-Lochplatte übertragen worden. Die so gewonnenen Klone wurden nach ca. 5-tägigem Wachstum weiter in 5 cm Kulturschalen expandiert und danach auf die Expression bestimmter Transgene mittels RT-PCR analysiert. In der Regel sind auf diese Weise 20 Klone einer Transfektion behandelt worden.

3.3.12 Durchflusszytometrie am FACS

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Verschiedene physikalische und chemische Zelleigenschaften werden simultan auf der Einzelzelebene gemessen. Relative Zellgröße, Granularität sowie bis zu zwölf verschiedene Fluoreszenzfarben können für viele tausend Zellen in kurzer Zeit ermittelt werden. Zur Analyse wird die Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen. Die Zellen erreichen so den Analysepunkt, einen Argonlaser mit 488 nm Wellenlänge, aufgereiht wie an einer Perlenschnur, was als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet wird.

Das Licht des Lasers wird durch die Zellen gestreut. Die Streuung des Lichtes wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie die intrazellulären Bestandteile beeinflusst. An Streulicht unterscheidet man den so genannten „forward scatter“, das Streulicht längs zum Anregungslichtstrahl, und den so genannten „side scatter“, das Streulicht im rechten Winkel zu dieser Achse. Der forward scatter ist dabei in erster Linie ein Maß für die Zellgröße (kleine Zellen streuen weniger), während der side scatter vor allem intrazelluläre Granularität misst (Granulozyten streuen mehr als Lymphozyten).

Die Messung der Fluoreszenz erfolgt hierbei entlang der Laserachse im 90°-Winkel. Die fluoreszierenden Stoffe absorbieren Licht in einem mehr oder weniger breiten Wellenlängenbereich. Dadurch werden Elektronen der äußeren Schalen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Mit dem Rücksprung auf das ursprüngliche Niveau wird ein Photon abgegeben, es geht Schwingungs-Rotations-Energie verloren. Daher hat das emittierte Licht eine größere Wellenlänge als das anregende. Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe haben

unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren. Die Emissionsspektren der Farbstoffe bestimmen nachfolgend die Kombinierbarkeit der Fluorochrome. Sie sollten sich in ihren Wellenlängenbereichen möglichst wenig überschneiden, um sie trennscharf auswerten zu können. In dieser Arbeit wurde ein Durchflusszytometer vom Typ FACS Calibur (BD) verwendet.

3.4 Versuchstiere

3.4.1 Zucht und Haltung der Mäuse

Für die beschriebenen Experimente wurden FVB/N-(*inbred*)-Mäuse gezüchtet. Die Mäuse wurden in einem künstlichen Tag-Nacht Rhythmus gehalten: Beleuchtung von 7:00 bis 19:00 Uhr, Dunkelheit von 19:00 bis 7:00 Uhr. Die Tiere wurden in Gruppen von 3 – 6 Tieren gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum.

3.4.2 Herstellung von transgenen Mäusen

Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mauslinien wurden im HET ('Haus für Experimentelle Therapie') vom dort ansässigen Transgenservice hergestellt. Der Genotyp der transgenen Mäuse wurde grundsätzlich durch *Southern-Blot* festgestellt.

3.4.3 Organentnahme

Für die Organentnahme wurden, mit Ausnahme für die Ovarpräparationen, nur adulte, ca. 8 Wochen alte, männliche Tiere eingesetzt. Für die Präparation von Ovargewebe wurden adulte, ca. 8 Wochen alte, weibliche Tiere eingesetzt. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Tier in Bauchlage fixiert und das Fell mit 70%igem Ethanol befeuchtet, um bei der Präparation Verunreinigungen durch Haare zu vermeiden. Das Operationsbesteck wurde zur Keimabtötung ebenfalls in 70%igem Alkohol aufbewahrt. Die Organe wurden nach der Entnahme kurz in 1x PBS gewaschen, auf Trockeneis gelegt und bei -80 °C aufbewahrt. Waren die Organe für die *in situ*-Hybridisierung bestimmt, so wurden sie wie in 3.1.13 beschrieben gesondert behandelt. Es wurden folgende Organe entnommen: Dickdarm, Dünndarm, Hinterwurzelganglien, Gehirn, Herz, Hoden, Leber, Lunge, Milz, Muskel, Nebennieren, Nieren, Ovar, Trigeminalganglien und Rückenmark.

3.5 Verhaltensbiologische Methoden

Alle Tierversuche fanden in den Verhaltenslaboren des HET ('Haus für Experimentelle Therapie') des Uniklinikums Bonn statt und wurden mit Erlaubnis der Bezirksregierung Köln durchgeführt. Es wurden grundsätzlich nur adulte 8 -12 Wochen alte, männliche Tiere für die Versuche verwendet. Die Versuche fanden immer zur gleichen Zeit (10 – 11 Uhr morgens) statt, um die Beeinflussung der Aktivität durch zirkadiane Rhythmen zu minimieren und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Abgesehen von den Versuchen zur Heimatkäfig-Aktivität wurden die Tiere bei allen Experimenten vor Beginn der experimentellen Prozeduren für 30 Minuten an die Untersuchungsräume habituiert. Alle Versuche fanden unter randomisierten und anonymisierten Bedingungen statt.

3.5.1 Allgemeine Verhaltenstests

3.5.1.1 Allgemeiner Verhaltenstest nach Irwin

In diesem Test werden zunächst Merkmale der Spontanaktivität, wie Körperhaltung, Bewegung und bizarre oder stereotype Verhaltensweisen aufgezeichnet. Danach wurden die Tiere auf motorisch–affektive Verhaltensäußerungen untersucht, wie Bewegungsmuster auf einem Balken, motorische Reaktion auf die neue Umgebung, räumliche Bewegung, Ausweichreaktion auf leichte Berührung durch den Experimentator, Reaktion auf teilweise oder komplette Aufhängung am Schwanz, Erregung durch das Packen des Tieres am Nacken und die Anzahl der Vokalisationen während des Tests. Als nächstes wurden sensorisch–motorische Verhaltensäußerungen erfasst. Dies sind die Reaktionen des Tieres auf räumliche Tiefe, die Reaktionen auf das Zusammendrücken des Schwanzes durch den Experimentator, die Reaktionen auf das Kneifen in die Pfote mittels einer Zange und der Schreckreflex auf ein lautes Geräusch. Zusätzlich wurden neurologische Auffälligkeiten analysiert. Hierzu wurden der Muskeltonus und der Gleichgewichtssinn non–invasiv untersucht. Zudem wurden noch grobe Auffälligkeiten wie Krämpfe oder Zuckungen vermerkt.

Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise findet man in der Anleitung von Irwin wieder (Irwin, 1968). Mit diesem Test wurden 7 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 5 nicht transgene Geschwistertiere (Kontrolltiere) untersucht.

3.5.1.2 Offenfeld

Dieser Test dient der Erfassung von lokomotorischer Aktivität und Explorationsverhalten. Das Offenfeld ist eine 48 x 48 cm große Arena mit einer weißen Oberfläche und 20 cm hohen Wänden aus transparentem Acryl, welche sich in einem abgedunkelten und schallgeschützten Raum befindet. An den Wänden sind 16 x 16 Infrarotsensoren angebracht, die eine Computerunterstützte Aufzeichnung und Analyse der Aktivität ermöglichen (TSE Systems). Dann wurde eine Maus an einen stets konstant gehaltenen Eckpunkt des Offenfeldes gesetzt und für einen Zeitraum von 20 Minuten ihr Verhalten aufgezeichnet. Es wurden pro Versuchstag 2 Durchgänge mit 8 Mäusen durchgeführt. Nach jedem Durchgang erfolgte eine Desinfektion der Arena. Die Auswertung der Verhaltensdaten erfolgte automatisiert mit der ActiMot-Software. Es wurden folgende Verhaltensparameter gemessen: Bewegungszeit (s), zurückgelegte Distanz (m), mittlere Geschwindigkeit (cm/s), Hyperaktivität (Zeit in Sekunden, die das Tier mit einer Geschwindigkeit höher als 20cm/s verbringt) und Anzahl der Aufrichtungen (Anzahl). Mit diesem Test wurden 8 Synapsin1-Transgene (Linie D17), 8 Synapsin1-Transgene (Linie D774), 8 Synapsin1-Transgene (Linie D67) und 8 nicht transgene Geschwistertiere untersucht.

3.5.1.3 Heimatkäfig-Aktivität

Diese Methode erlaubt die Erfassung der lokomotorischen Aktivität der Tiere ohne Beeinflussung durch die experimentelle Umgebung. Die Heimatkäfig-Aktivität wird hierbei gemessen, indem die Tiere in Einzelhaltung in ihrem Heimatkäfig verbleiben und ihre Bewegungen mit passiven Infrarotsensoren erfasst werden, die eine Computerunterstützte Aufzeichnung und Analyse der Aktivität ermöglichen (TSE Systems). Diese Sensoren befinden sich auf den Gittereinsätzen der Heimatkäfige, welche sich für die Dauer des Experiments in einer abgedunkelten und schallgeschützten Kammer befinden. Die Versuche fanden immer zur gleichen Zeit (18 Uhr abends) statt und dauerten exakt 72 Stunden. Die für dieses Experiment eingesetzten Tiere wurden 4 Wochen vorher einzeln in Käfige gesetzt. Es wurden immer 4 Tiere parallel untersucht. Die Lichtverhältnisse in der Heimatkäfiganlage waren durch eine Zeitschaltung auf einen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus eingestellt: Beleuchtung von 7:00 – 19:00 Uhr, Dunkelheit von 19:00 – 7:00 Uhr. Mit diesem Test wurden 8 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 8 nicht transgene Geschwistertiere untersucht.

3.5.2 Aggressionstest

3.5.2.1 Resident-intruder Test

Dieser Test wird angewendet um aggressive Reaktionen in männlichen Mäusen zu quantifizieren. In diesem Test wurde für einen Zeitraum von drei Wochen eine Kohorte von Mäusen einzeln in Käfigen untergebracht. Diese Mäuse entwickeln ein ausgeprägtes Territorialverhalten und dulden keine weiteren Männchen in ihrem Territorium. Eine zweite Kohorte wurde in kleinen Gruppen (4 – 5 Mäuse je Käfig) untergebracht. Diese Tiere entwickeln kein Territorialverhalten. Für den Test wurde aus der Gruppenkohorte ein Tier in den Käfig einer einzeln gehaltenen Maus für einen Zeitraum von 5 Minuten gesetzt. Da viele Männchen erst kämpfen, wenn ihr Territorium mehrfach verletzt wird, wurde der Test mit denselben Tieren nach 1 Stunde wiederholt. Die Tests wurden in einem abgedunkelten und schallgeschützten Raum durchgeführt. Soziales und aggressives Verhalten wurde per Videoaufnahmen aufgezeichnet und später am Monitor ausgewertet. Hierbei wurden die Latenz bis zum ersten Angriff und die Anzahl der Angriffe aufgezeichnet. Als Angriff wurde die zeitlich unmittelbare, aufeinander folgende Sequenz von mindestens zwei aggressiven Verhaltensweisen definiert. Als aggressive Verhaltensweisen zählten Beißen, Verfolgen, Anspringen oder Ringen. Mit diesem Test wurden 10 Synpasin1-Transgene (Linie D17) und 10 nicht transgene Geschwistertiere untersucht.

3.5.3 Testverfahren zur Messung der Leistung des Arbeitsgedächtnis

3.5.3.1 Y-Labyrinth

Mit Hilfe dieser Methode wird das Arbeitsgedächtnis der Tiere untersucht. Die Maus befindet sich dabei in einem weißen, wie ein Y geformten Apparat auf einer erhöhten Plattform, welche in einem abgedunkelten und schallgeschützten Raum aufgestellt ist. Das Tier wird in die Gabelung der drei Arme des Y platziert und es werden die Sequenz und Häufigkeit des Betretens und Verlassens der Arme erfasst. Das Verhalten der Maus im Y-Labyrinth wurde für einen Zeitraum von 5 Minuten durch Videoaufnahmen aufgezeichnet und später am Monitor ausgewertet. Nach jedem Durchgang erfolgte eine Zwischendesinfektion des Labyrinths. Die in diesem Experiment gemessenen Parameter waren die Gesamtzahl des Betretens der Gänge von der Gabelung aus ('Gesamtzahl der Wechsel'), die Gesamtzahl der Eintritte in den Arm, von dem aus das Tier die Gabelung betrat ('Gleicher Arm'), die Gesamtzahl der Eintritte in den unmittelbar vorherig aufgesuchten Arm ('Vorheriger Arm') und die Gesamtzahl der Eintritte in den neuen, nicht unmittelbar vorherig aufgesuchten Arm

('Neuer Arm'). Die Anzahl der Eintritte in den neuen Arm wird in diesem Test als Indikator für die Güte des Arbeitsgedächtnisses verwendet. Mit diesem Test wurden 9 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 10 nicht transgene Geschwistertiere untersucht.

3.5.4 Tests zur Messung von Angstverhalten

3.5.4.1 Schreckreaktion ('*Startle response*')

Mit Hilfe dieser Methode wird das von der Situation unabhängige Angstniveau der Tiere gemessen. Als Schreckreiz diente ein akustisches Signal von 40 Millisekunden Dauer. Die Maus befindet sich dabei in einem Käfig auf einem Vibrationssensor, der in einer schallisolierten, schwach beleuchteten Kammer mit einem Lautsprechersystem positioniert ist (TSE Systems). Diese Messapparatur ist an eine Computeranlage mit automatisierter Signalverarbeitung angeschlossen. Die Maus wurde in den Apparat gesetzt und nach fünf Minuten Eingewöhnungszeit bei 65 db Schalldruck Hintergrundgeräusch wurde die Schreckreaktion zehn Mal (Zeit zwischen den Signalen: 20 - 40 Sekunden) gemessen (Davis et al., 1993; Davis et al., 1982). Es wurden akustische Signale mit 60, 80, 100 und 110 dB Schalldruck eingesetzt. Gemessen wurde die Vibrationsreaktion nach jedem akustischem Signal. Für jeden Schalldruck wurde eine Gruppe von je 8 Synapsin1-Transgenen (Linie D17) und nicht transgenen Geschwistertieren untersucht.

3.5.4.2 Offenfeld

Das wie unter 3.5.1.2 beschriebene Offenfeld kann auch zur Erfassung von Angstverhalten verwendet werden. Die Häufigkeit und Zeit, welche die Tiere im zentralen Bereich verbringen, dienen als Maß für die Ängstlichkeit der Tiere. Die hierfür untersuchten Verhaltensparameter waren die Häufigkeit der Besuche im zentralen Bereich (Anzahl) und die im zentralen Bereich verbrachte Zeit (s). Ängstliche Tiere besuchen den zentralen Bereich des Offenfeldes weniger häufig und halten sich dort auch nicht sehr lange auf. Es wurden 8 Synapsin1-Transgene (Linie D17), 8 Synapsin1-Transgene (Linie D774), 8 Synapsin1-Transgene (Linie D67) und 8 nicht transgene Geschwistertiere mit diesem Test untersucht.

3.5.5 Test zur Messung von sensomotorischem *Gating*

3.5.5.1 Präpulsinhibition (PPI)

Präpuls Inhibition (PPI, '*prepulse inhibition*') beschreibt einen Prozess, bei dem die durch einen lauten Puls ausgelöste Schreckreaktion reduziert wird, wenn vor diesem Puls ein leiserer Präpuls präsentiert wird, der nicht zu einer Schreckreaktion führt. Der Test erfasst schizoides Verhalten, da schizophrene Patienten Defizite in diesem Paradigma zeigen (Kumari et al., 2000). Die hierfür nötige Messapparatur ist identisch mit der unter 3.5.4.1 beschriebenen Anlage.

Auf eine Eingewöhnungszeit von 5 Minuten, in welcher die Tiere keine weiteren Stimuli mit Ausnahme des Hintergrundrauschens (60 db) erhielten, folgte direkt im Anschluss das Testprogramm. Das gesamte Programm bestand aus 2 verschiedenen Durchgängen, welche den Tieren im Verlauf des Experiments je 10 Mal randomisiert präsentiert wurden.

1. Durchgang: Schreckreiz (12 kHz, 100 dB, Dauer 20 ms)

2. Durchgang: Präpuls (100 ms vor dem Schreckreiz 12 kHz, 80 dB, Dauer 20 ms)

Die als Intertrial-Länge bezeichnete Zeit zwischen den einzelnen Durchgängen wurde während des gesamten Versuchsablaufs zwischen 20 und 30 Sekunden randomisiert. Gemessen wurde die Vibrationsreaktion nach jedem Durchgang. Es wurden 8 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 8 nicht transgene Geschwistertiere mit diesem Test untersucht. Die prozentuale PPI wurde wie folgt berechnet:

$$\%PPI = 100 - [(Reaktion \text{ auf Schreckreiz mit Präpuls}) / (Reaktion \text{ auf Schreckreiz})] \times 100.$$

3.5.6 Tests zur Nozizeption

3.5.6.1 Brennstrahl-Test ('*Tail-flick*')

Dieser Test dient der Messung von spinalen Reflexreaktionen auf schmerzhafte Reize. Hierzu wird ein schmerzhafter Brennstrahl auf den Mausschwanz gerichtet und die Latenz der Reflexreaktion der Maus auf diesen Stimulus gemessen (D'Amour and Smith, 1941). Für den Brennstrahl-Test wurde der voll automatisierte *Analgesia Tail-Flick Apparatus* (Columbus Instruments) verwendet. Die Intensität der Hitzequelle wurde so angepasst, dass die durchschnittliche Latenz zwischen 3 - 5 Sekunden lag. Um Gewebeschädigungen in solchen Tieren zu vermeiden, die auf Grund einer genetischen Veränderung oder einer pharmakologischen Intervention stark erhöhte Schmerzreizschwellen haben, wurde das Experiment nach spätestens 10 Sekunden abgebrochen, selbst wenn die Tiere noch keine Reaktion gezeigt haben. Mit diesem Test wurden 13 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und

13 nicht transgene Geschwistertiere untersucht.

3.5.6.2 Wärmeplatten-Test ('*Hot plate*')

Der Wärmeplatten-Test erfasst supraspinale Schmerzverarbeitung. Es werden die Reaktionen der Tiere auf lokal applizierte thermische Schmerzreize gemessen. Dazu wird die Maus auf eine Platte gesetzt, deren Oberflächentemperatur äußerst genau auf eine gleichmäßige Temperatur einreguliert werden kann. Die Mäuse werden solange auf der Oberfläche gelassen, bis sie folgende Schmerzreaktionen zeigen: Schütteln, Lecken der Pfoten und Springen. Die Latenzzeit bis zum Auftreten dieser Schmerzreaktionen dient als Maß für die Schmerzreizschwelle (Eddy and Leimbach, 1953; Woolfe and MacDonald, 1944). Bei einer Oberflächentemperatur von 52 °C beträgt diese Latenzzeit bei Mäusen in der Regel 20 - 40 Sekunden. In der vorliegenden Arbeit wurde die voll automatisierte 1440 Analgesia Hot plate (Columbus Instruments) verwendet. Die Maus wurde auf die 52 °C warme Platte gesetzt und die Latenzzeit der oben genannten Schmerzreaktionen aufgezeichnet. Das Experiment wurde spätestens nach 60 Sekunden abgebrochen. Mit diesem Test wurden 15 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 15 nicht transgene Geschwistertiere untersucht.

3.5.6.3 Krümm-Test ('*Writhing*')

Der Krümm-Test ist ein Verfahren zur Messung von intestinalem Schmerz. Durch eine intraperitoneale Injektion von Essigsäure (0,6 %, in einem Volumen von 200 – 300 µl) wird eine intestinale nozizeptive Reaktion ausgelöst. Die Versuchstiere reagieren einige Minuten nach der Injektion mit einem linksseitigen Dehnen des Torsos. Die Häufigkeit dieser Reaktion wurde ausgezählt und diente als Maß zur Bestimmung der Schmerzintensität (Koster et al., 1959). In der vorliegenden Arbeit erhielten die Tiere die intraperitoneale Injektion von Essigsäure und wurden für einen Zeitraum von 30 Minuten nach der Injektion beobachtet. Anschließend wurden sie sofort durch CO₂-Inhalation getötet. Die Anzahl der Krümmungen pro Minute wurde in diesem Zeitraum aufgezeichnet. Mit diesem Test wurden 10 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 10 nicht transgene Geschwistertiere untersucht.

3.6 Interaktion mit Neurotransmittersystemen

Die Interaktion des Genotyps, Transgen oder Wildtyp, mit der pharmakologischen Manipulation verschiedener Neurotransmittersysteme wurde mit einigen der unter (3.5) beschriebenen Verhaltenstests analysiert. Im Folgenden wird beschrieben, welche Drogen verabreicht wurden, welche Verhaltenstests durchgeführt wurden und wie die

Verhaltenstests jeweils modifiziert wurden. Nach Ablauf der einzelnen Experimente wurden die Versuchstiere durch CO₂-Inhalation getötet.

3.6.1 Neurotransmittersystem Katecholamine

Zu den Katecholaminen zählen die biogenen Amine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Dieses Neurotransmittersystem wurde durch die Verabreichung von Ritalin und Amphetamin manipuliert.

3.6.1.1 Ritalin

Ritalin ist auch unter dem Namen Methylphenidat oder threo-Methyl α -phenyl- α -(2-piperidyl)Acetat-Hydrochlorid bekannt und ist ein synthetisches Sympathomimetikum, das aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Im Zentralnervensystem wirkt es als Stimulans (ZNS-Stimulans). Methylphenidat hat eine hohe Affinität zu membranständigen Katecholamintransportern in der Plasmamembran dopaminerger, noradrenerger und adrenerger Neuronen. Aufgrund dieser Affinität hemmt Methylphenidat kompetitiv die Wiederaufnahme von Dopamin oder Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt und wirkt somit als indirekter Agonist für Rezeptoren dieser Neurotransmitter (Forth et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ritalin auf das lokomotorische Verhalten im Offenfeld untersucht. Die Mäuse wurden für 30 Minuten in das Offenfeld gesetzt und erhielten nach Ablauf dieser Zeit eine intraperitoneale Injektion von Saline oder 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg oder 10 mg/kg Ritalin in Saline. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils ca. 200 – 300 μ l. Danach wurden die Tiere für weitere 90 Minuten in das Offenfeld gesetzt. Gemessen wurde die zurückgelegte Distanz (m) in den 30 Minuten vor der Injektion und in der Zeit nach der Injektion. Pro Dosis wurden 8 Synpasin1-Transgene (Linie D17) und 8 nicht transgene Geschwistertiere eingesetzt.

3.6.1.2 Amphetamin

Amphetamin, auch bekannt als (+)- α -Methylphenethylamin Sulfat-Salz, ist ein synthetisches Sympathomimetikum, das aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und als ZNS-Stimulans wirkt. Die physiologische Wirkung von Amphetamin ist der von Methylphenidat ähnlich, jedoch ist die Noradrenalinfreisetzung durch Amphetamin erheblich schwächer als die Freisetzung von Dopamin und spielt eigentlich nur bei hohen Dosen eine Rolle (Kuczenski et al., 1983).

Die Mäuse wurden für 30 Minuten in das Offenfeld gesetzt und erhielten nach Ablauf dieser Zeit eine intraperitoneale Injektion von Saline oder 0,625 mg/kg, 1,25 mg/kg oder 2,5 mg/kg Amphetamin in Saline. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils ca. 200 – 300 µl. Danach wurden die Tiere für weitere 90 Minuten in das Offenfeld gesetzt. Gemessen wurde die zurückgelegte Distanz (m) in den 30 Minuten vor der Injektion und in der Zeit nach der Injektion. Pro Dosis wurden 8 Synpasin1-Transgene (Linie D17) und 8 nicht transgene Geschwistertiere eingesetzt.

3.6.2 Neurotransmittersystem Glutamat

Das glutamaterge System wurde durch Verabreichung von Phencyclidin manipuliert. Phencyclidin oder 1-(1-Phenylcyclohexyl)Piperidin (PCP) ist ein synthetisches Psychotomimetikum und bindet mit hoher Affinität an eine Bindestelle (PCP-Rezeptor) in glutamatergen Ionenkanälen vom N-methyl-D-aspartat-Typ (NMDA-Rezeptor). Dort inhibiert PCP auf eine nicht kompetitive Weise die Aktivität des NMDA-Rezeptors (Anis et al., 1983). Die Mäuse wurden für 30 Minuten in das Offenfeld gesetzt und erhielten nach Ablauf dieser Zeit eine subkutane Injektion von Saline oder 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg oder 10 mg/kg PCP in Saline. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils ca. 200 – 300 µl. Danach wurden die Tiere für weitere 90 Minuten in das Offenfeld gesetzt. Gemessen wurde die zurückgelegte Distanz (m) in den 30 Minuten vor der Injektion und in der Zeit nach der Injektion. Pro Dosis wurden 8 Synpasin1-Transgene (Linie D17) und 8 nicht transgene Geschwistertiere eingesetzt.

3.6.3 Neurotransmittersystem Acetylcholin

Das cholinerge System wurde durch Verabreichung von Nikotin manipuliert. Nikotin, oder (-)-1-Methyl-2-(3-pyridyl)Pyrrolidin (-)-Nicotin (+)-bitartrat-Salz, ist das Hauptalkaloid der zu den Nachtschattengewächsen gehörenden Tabakpflanzen. Nikotin ist ein Agonist des nikotinergen Acetylcholinrezeptors und kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke überwinden und auch im zentralen Nervensystem wirken (Forth et al., 1998).

3.6.3.1 Einfluss von Nikotin auf lokomotorisches Verhalten

Die Mäuse wurden für 30 Minuten in das Offenfeld gesetzt und erhielten nach Ablauf dieser Zeit eine subkutane Injektion von Saline oder 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,7 mg/kg oder 1 mg/kg Nikotin in Saline. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils ca. 200 – 300 µl.

Danach wurden die Tiere für weitere 20 Minuten in das Offenfeld gesetzt. Gemessen wurde die zurückgelegte Distanz (m) in den 30 Minuten vor der Injektion und in der Zeit nach der Injektion. Pro Dosis wurden 8 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 8 nicht transgene Geschwistertiere eingesetzt.

3.6.3.2 Nikotin-induzierte Analgesie

Zur Messung von Nikotin-induzierter Analgesie wurden *Tail-flick*, *Hot plate* und *Writhing*-Test wie unter 3.5.6 beschrieben durchgeführt. 3 Minuten vor Beginn des Tail-flick-Tests wurde den Tieren subkutan eine Injektion von Saline oder 0,125 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,625 mg/kg, 0,75 mg/kg oder 1 mg/kg Nikotin in Saline verabreicht. Für den *Hot plate*- und *Writhing*-Test wurden neben Saline Dosen von 0,25, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg und 1 mg/kg Nikotin in Saline verwendet. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils ca. 200 – 300 µl. Pro Dosis wurden 8 Synapsin1-Transgene (Linie D17) und 8 nicht transgene Geschwistertiere eingesetzt

3.7 Elektrophysiologische Methoden

Die in dieser Arbeit hergestellten transgenen Tiere der Synapsin1-D17 Linie wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. med. D. Swandulla am Institut für Physiologie II der Universität Bonn elektrophysiologisch untersucht. Hierzu wurden *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen von Gesamtströmen durch nikotinische Acetylcholinrezeptorkanäle in Neuronen aus Trigeminalganglien von transgenen und nicht-transgenen Tieren durchgeführt. Die Ableitungen erfolgten in Verbindung mit Applikationen von Nikotin, Mecamylamin und alpha-Bungarotoxin.

3.8 Statistische Methoden

Die deskriptive Statistik erfolgte anhand von Mittelwerten und deren Standardfehlern (S.E.M.). Alle Rohdaten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL® (Microsoft) aufgelistet und mit der Statistiksoftware Prism 4 (GraphPad Software) inferenzstatistisch ausgewertet. Paarweise Mittelwertsvergleiche wurden mit *Student's t-Test* oder dem *Mann-Whitney U-Test* auf statistische Signifikanz überprüft. Wurden mehr als zwei Parameter analysiert, wurde entweder eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) oder bei gestuften Parametern eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. Nach der einfaktoriellen ANOVA wurde je nach Bedarf ein *Tukey'scher* oder *Dunnett post-hoc* Mittelwertsvergleich gemacht. Nach zweifaktorieller ANOVA wurde je nach Bedarf ein *Bonferroni post-hoc*

Mittelwertsvergleich durchgeführt. Bei den jeweiligen Testverfahren wurden Unterschiede dann als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ wurden die Unterschiede als sehr signifikant bewertet.

3.9 Verwendete Datenbanken und Programme

Die humane und murine Genomsequenz kann sowohl auf dem *golden-path*-Browser der Universität Santa Cruz (USA) unter <http://genome.ucsc.edu/index.html>, dem Ensembl-Browser unter <http://www.ensembl.org/>, als auch beim NCBI unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/> abgerufen werden.

FANTOM DB (<http://fantom3.gsc.riken.jp/db/>)

Die FANTOM Database bietet Zugriff auf alle cDNA-Klone aus den FANTOM2 und FANTOM3 Datensätzen. Es können DNA- und Aminosäuresequenzen eingesehen und transkriptionelle Einheiten dargestellt werden. Zudem liegen Informationen zu Gewebeherkunft der cDNA-Klone, Splice-Muster der cDNA-Gene und deren aktueller Annotation vor.

BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>)

Der „BCM (*Baylor College of Medicine*) Search Launcher“ (Smith et al., 1996) bietet zahlreiche Werkzeuge zum Bearbeiten und Vergleichen von DNA- und Proteinsequenzen an.

***Pfam*-Proteindatenbank (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam>)**

In der *Pfam*-Proteindatenbank am Sanger Center (*Protein families database of alignments and HMMs*) finden sich unter anderem Beschreibungen zu einzelnen konservierten Proteindomänen.

NCBI Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Auf der Homepage des „*National Center for Biology and Information*“ (NCBI) finden sich zahlreiche *Links* zu Programmen und Datenbanken. Die am häufigsten verwendeten sind im Folgenden aufgeführt:

ORF-Finder:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

Mit dem Programm ORF-Finder kann man sich offene Leseraster in allen 6 Leserahmen anzeigen lassen und die vorhergesagte Proteinsequenz im FASTA-Format herunterladen.

ePCR:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/epcr.cgi>

Mit der elektronischen PCR (ePCR) kann man genomische DNA-Sequenzen auf Marker untersuchen, die Hinweise auf die Lokalisation im Genom geben.

Human-Mouse Homology Map:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Homology/>

In dieser Homologiekarte von Mensch und Maus sind die homologen Chromosomenabschnitte mit den orthologen Genen der beiden Spezies gegenübergestellt.

NCBI mouse genome resources:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/M_musculus.html

Unter *mouse genome resources* kann man alle verfügbaren Daten des Mausgenomsequenzierungsprojekts abrufen.

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, (Altschul et al., 1990):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>

Mit dem Programm Blast wurden neue Sequenzen auf Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sequenzen überprüft. Man kann Nukleotidsequenzen untereinander (Blastn), Proteinsequenzen untereinander (Blastp), Nukleotidsequenzen mit Proteinsequenzen (Blastx) oder auch translatierte Sequenzen mit Proteinsequenzen (tblastx) vergleichen. Mit Blast 2 Sequences können zwei ausgewählte Sequenzen miteinander paarweise verglichen.

OMIM (*Online Mendelian Inheritance of Man* (McKusick and Amberger, 1993):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

Diese Datenbank enthält einen Katalog menschlicher Gene und genetischer Störungen. Die OMIM-Datenbank enthält darüber hinaus genaue Beschreibungen, Abbildungen und Literaturhinweise.

ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>)

Mit dem Programm ClustalW wurden multiple *Alignments* von DNA- und Aminosäuresequenzen angefertigt.

Vector NTI 7:

Mit Vector NTI 7 von Invitrogen wurden Restriktionskarten von DNA-Sequenzen und Vektorkarten der klonierten Plasmide erstellt.

Prism 4:

Mit Prism 4 wurden die statistischen Analysen ausgeführt.

Pulse:

Mit Pulse wurden die die Daten aus den elektrophysiologischen Untersuchungen aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Auswahl der Kandidatengene für die Expressionsanalyse

Aus den 90 von Gustincich et al. (2003) beschriebenen Kandidatengenen für potentielle Neurotransmitter und neuromodulatorische Peptide sollten nur solche Gene für die weitere Analyse ausgewählt werden, die (1) hypothetische Proteine mit noch nicht beschriebener Funktion kodieren, (2) nur kurze Peptide (100 – 200 Aminosäuren) kodieren, (3) ausschließlich in Geweben des Zentralnervensystems oder im Hoden exprimiert sind und (4) deren Expression durch die Existenz zusätzlicher ESTs ('expressed sequence tag') belegt ist. Anhand dieser Kriterien konnte eine Auswahl von 39 Kandidatengenen erstellt werden (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Übersicht über die 39 analysierten Transkripte und den aktuellen Stand ihrer Benennung bei *Mus musculus*.

Transkript	Blastp (Stand 09-03-2007)
1110017I16	Hypothetisches Protein
1700015F17	Hypothetisches Protein
1700029I15	Hypothetisches Protein
1700058C13	SPLUNC 3-Homolog Vorläuferprotein
1700086D15	Hypothetisches Protein
1810008K14	Spermatogenese assoziiertes Protein 11
2010004A03	Hypothetisches Protein
2900024P20	Hypothetisches Protein
4930444E23	Ähnlich zu prolinreichem Proteoglykan 2
4921529N20	Hypothetisches Protein
4930470L04	Hypothetisches Protein
4930474M22	Hypothetisches Protein
4930504O13	Hypothetisches Protein

(Fortsetzung auf nächster Seite)

Tab. 4.1 (Fortsetzung)

Transkript (RIKEN-ID)	Blastp (Stand 09-03-2007)
4930506F14	Hypothetisches Protein
4930525K10	Beta-defensin 21
4930527B16	Hypothetisches Protein
4930569O18	Sec15l2 Protein
4930597L12	Hypothetisches Protein
5430401F13	Hypothetisches Protein mit glycinreicher Region
5430427O21	Ähnlich zu Protein UNQ689/PRO1329
5530400C23	Ähnlich zu GRP-CB CR Polypeptid
6430562P08	TAF42 Protein
6530402D11	Hypothetisches Protein
6720470G16	Hypothetisches Protein
9330119M13	Hypothetisches Protein
9330186K11	MTERF Domäne Protein 2
A830006A04	Ähnlich zu Zinkfinger-DHHC Domäne Protein 22
A930024F09	Protein mit Cytochrom b5-gleicher Häm/Steroid Bindedomäne
B230311P14	Hypothetisches Protein
B230316E19	Hypothetisches Protein
B930017N20	Coiled-coil Domäne tragendes Protein 44
D130015I23	Ähnlich zu Tetratricopeptid repeat Domäne Protein 13
D130060C09	Casc 4 Protein
D930016B10	Selenoprotein SelM
D930031A20	Hypothetisches Protein
D930048N14	Hypothetisches Protein
E130007J10	Meteorin (glialer Zelldifferenzierungsregulator)
E130115E03	Lypd6

4.2 Expressionsanalyse der 39 Kandidatengene

Die mRNA-Expression der 39 Kandidatengene wurde mittels RT-PCR in unterschiedlichen murinen Geweben analysiert. In Tabelle 4.2 ist die mRNA-Expression der 39 Transkripte in verschiedenen Geweben gegenübergestellt. Es wurden die in (2.7) beschriebenen RT-PCR Primer für β -Actin (interne Kontrolle) und die RIKEN-Transkripte verwendet.

Tab. 4.2: Expressionsprofil der analysierten Transkripte für diverse Mausorgane.

Transkript	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1110017I16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1700015F17	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
1700029I15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1700058C13	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1700086D15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1810008K14	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2010004A03	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
2900024P20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4930444E23	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
4921529N20	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
4930470L04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4930474M22	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
4930504O13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
4930506F14	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
4930525K10	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
4930527B16	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4930569O18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4930597L12	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
5430401F13	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5430420P03	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
5430427O21	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5530400C23	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
6430562P08	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
6530402D11	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
6720470G16	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
9330119M13	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
9330186K11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A830006A04	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
A930024F09	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
B230311P14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B230316E19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B930017N20	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
D130015I23	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
D130060C09	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D930016B10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D930031A20	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
D930048N14	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E130007J10	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
E130115E03	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-

+ = PCR-Produkt vorhanden; - = PCR-Produkt nicht vorhanden. 1 = Gehirn; 2 = Rückenmark; 3 = Testis; 4 = Ovar; 5 = Nieren; 6 = Nebennieren; 7 = Skelettmuskel; 8 = Herz; 9 = Leber; 10 = Lunge; 11 = Milz; 12 = Dickdarm; 13 = Dünndarm.

Aufgrund der Expression im Zentralnervensystem und der im Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Homologien zu Lynx1 wurde das Transkript E130115E03 in den Fokus der weiteren Analyse gerückt. Dieses Transkript wird vom Lypd6-Gen (Ly6-Plaur-Domäne6) kodiert, welches somit als Hauptkandidatengenen dieser Arbeit ausgewählt wurde.

4.3 Das murine Lypd6-Gen

4.3.1 Chromosomale Lokalisierung des murinen Lypd6-Gens

Mittels Blastp-Analyse des Mausgenoms wurde das murine Lypd6-Gen auf Chromosom 2 an der Position 49888582 – 50015573 lokalisiert. Der Beginn des Gens befindet sich im genomischen Kontingent *Contig AL806528.14*. Abbildung 4.1 zeigt eine schematische Darstellung des Chromosoms 2 der Maus.

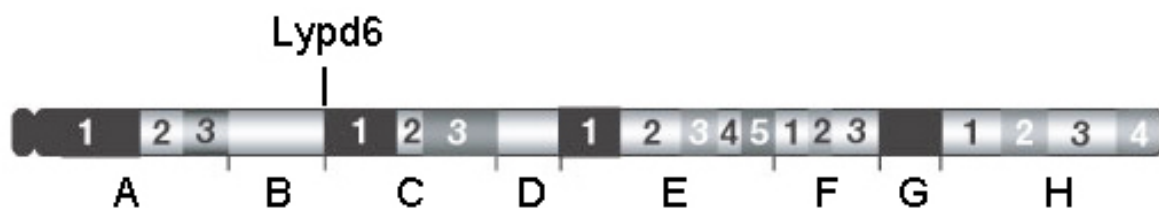


Abb. 4.1 Schematische Darstellung von Mauschromosom 2.

4.3.2 Der murine Lypd6-Genlokus

Der genomische Kontext, in dem sich das murine Lypd6-Gen befindet, ist Abbildung 4.2 zu entnehmen. Dargestellt sind neben dem Lypd6-Gen auch die unmittelbar benachbarten Gene Kif5c (Kinesin Familie Mitglied 5C), 2310010M24Rik (ein zum Lypd6-Gen paraloges Gen mit unbekannter Funktion), 2010311D03Rik (Gen mit unbekannter Funktion) und der Genlokus LOC666781 (hypothetischer Genlokus mit unbekannter Funktion).

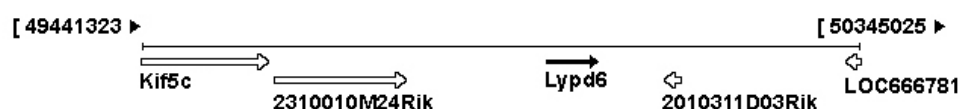


Abb. 4.2 Schematische Darstellung des genomischen Lokus des murinen Lypd6-Gens. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Chromosom 2 (Position 49441323 - 50345025).

4.3.3 Genomische Organisation des murinen Lypd6-Gens und seiner Orthologe in den Genomen von Mensch und Zebrafisch

Um die phylogenetische Konservierung des Lypd6-Gens zu analysieren wurde durch Blast-Analyse der Genome von Maus (*Mus musculus*), Mensch (*Homo sapiens*) und Zebrafisch (*Danio rerio*) mit der Sequenz des cDNA-Klon E130115E03 jeweils die Intron/Exon-Struktur des Lypd6-Gens ermittelt und diese dann zwischen den Spezies verglichen. Das murine Lypd6-Gen befindet sich auf Chromosom 2 und besteht aus 6 Exonen, von denen 4 kodierend sind. Das humane Gen (Chromosom 2) und das Zebrafischgen (Chromosom 9) bestehen jeweils aus 5 Exonen, von denen 4 kodierend sind. Der Vergleich der genomischen Organisation des murinen Lypd6-Gens mit den Organisationen der zu Lypd6 orthologen Gene von Mensch und Zebrafisch ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.

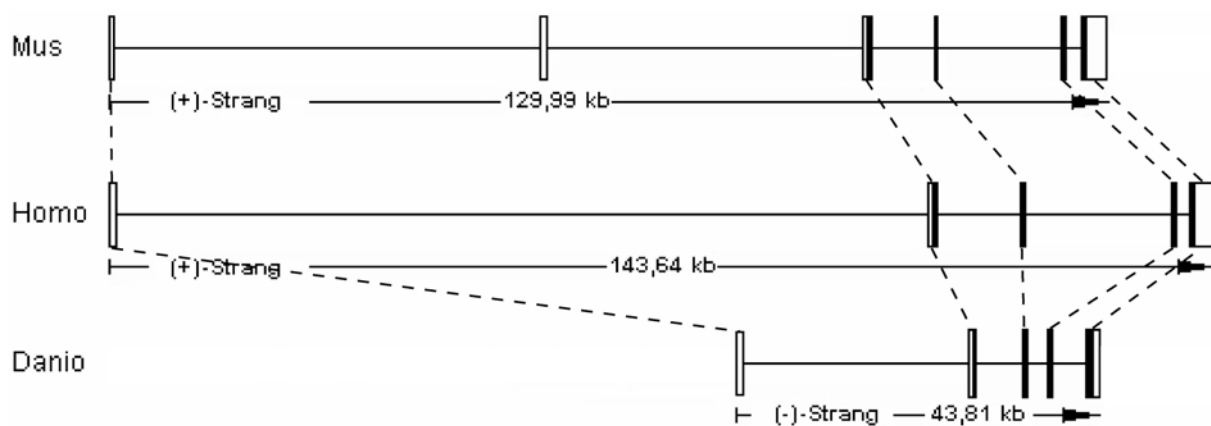


Abb. 4.3 Vergleich der genomischen Organisation des Lypd6-Gens von Maus, Mensch und Zebrafisch. Angegeben sind die Längen der Gene, die Anzahl der Exone und der Strang auf dem die Gene jeweils lokalisiert sind. Die Intron/Exon-Verteilungen wurden mittels der Ensembl-Datenbank skizziert. Die Kennungen der Transkripte sind: Lypd6 Maus: ENSMUST00000053208; Lypd6 Mensch: ENST00000334166; Lypd6 Zebrafisch: ENSDART00000020884. Die Rechtecke stellen die Exone der Gene dar, wobei die ausgefüllten Bereiche den offenen Leserastern der Proteine entsprechen. Die horizontale Linie steht für Intronsequenzen. Innerhalb der Gene für jede Spezies sind die Exone und Introne maßstabsgetreu angegeben. Korrespondierende Exone sind mit gestrichelten Linien verbunden.

Eine Gegenüberstellung der Intron/Exon-Verteilung der Lypd6-Gene von Maus, Mensch und Zebrafisch (siehe Abb. 4.3) zeigt ähnliche Genstrukturen. Die Anzahl kodierender Exone ist bei allen untersuchten Spezies gleich. Die Introngrößen sind zwar jeweils unterschiedlich, jedoch zumindest für Maus und Mensch sehr ähnlich. Zusätzlich wurden noch die Genome der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und des Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) analysiert, jedoch wurden dort keine zum murinen Lypd6 orthologen Gene gefunden.

4.4 Das murine Lypd6-Protein

Die mRNA des murinen Lypd6-Gens kodiert für ein Protein von 171 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 19,064 kDa. Am Amino-Terminus des Proteins befindet sich ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid, innerhalb dessen sich ein Sequenzabschnitt geringer Komplexität befindet. Eine Ly6-UPAR-Domäne (*'Lymphocyte antigen 6 urokinase-like plasminogen activator receptor'*) liegt zwischen den Aminosäuren 47 – 141. Diese Domäne ist konstituiert durch eine Sequenz von ca. 90 Aminosäuren mit einem konservierten Muster von 8 – 10 Cysteinresten (Behrendt et al., 1991). Hinter der Ly6-UPAR-Domäne befindet sich an der Position 147 – 149 eine Konsensussequenz für die Platzierung eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers (Udenfriend and Kodukula, 1995). Die Proteinstruktur ist in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt. In der Ensembl-Datenbank sind auf Exon 6 des Lypd6-Gens 3 SNPs (*'single nucleotide polymorphism'*). Zwei dieser SNPs führen zu keinem Aminosäureaustausch im Lypd6-Protein (synonyme SNPs). Der dritte SNP hat jedoch einen Aminosäureaustausch (Asparagin→Serin) im Lypd6-Protein zur Folge (nicht-synonymer SNP).

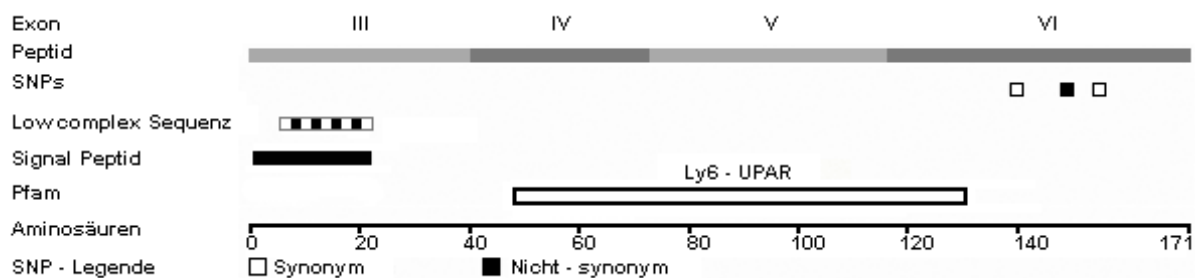


Abb. 4.4 Struktur des murinen Lypd6-Proteins. Angegeben sind die korrespondierenden Exone, SNPs (*'single nucleotide polymorphism'*), Lage und Länge von Low complex Sequenz (Sequenz geringer Komplexität), Signal Peptid und Ly6-UPAR-Domäne. Die Proteinstruktur wurde mittels der Ensembl-Datenbank skizziert.

4.4.1 Vergleich des Lypd6-Proteins der Maus mit Lypd6-Proteinen anderer Spezies

Zur Analyse der phylogenetischen Konservierung auf Proteinebene wurden die Aminosäuresequenzen der Lypd6-Proteine von *Mus musculus*, *Homo sapiens* und *Danio rerio* mit dem Programm ClustalW verglichen. Zwischen allen drei Spezies konnten starke Homologien der Aminosäuresequenzen gefunden werden (Abb. 4.5). Der Grad an Homologie zwischen dem Lypd6-Protein von *Homo* und *Mus* beträgt 95 % und zwischen *Homo/Mus* und *Danio* 70 % (Tab. 4.3).

<i>Mus</i>	MEPSPALAWLLLSLVADCLKAAQSRDFTVKDI IYLHPSTTPYPGGFKCFTCEKAADNYE	60
<i>Homo</i>	MEPGPALAWLLLSLLADCLKAAQSRDFTVKDI IYLHPSTTPYPGGFKCFTCEKAADNYE	60
<i>Danio</i>	MEPWPLMAWGLMTAITGWIKAVQSRDFTVKDI IFLHPSTTPYPGGFKCFTCEDAPDNYE	60
<i>Mus</i>	CNRWAPDIYCPRDTRYCYTOHTMEVTGNSISVTKRCVPLEECLSTGCRDSEHECHKVCTS	120
<i>Homo</i>	CNRWAPDIYCPRETTRYCYTOHTMEVTGNSISVTKRCVPLEECLSTGCRDSEHECHKVCTS	120
<i>Danio</i>	CNRWAPDLYCPRESRYCYTHHKMSWDGNTVSVTKRCVPLEDCLOTGCSIDHEGNRVCTA	120
<i>Mus</i>	CCEGNICNLPLPRNETDAITFATTSPINQTNGHPHCVSVIVSCLWVWLGLTL----	171
<i>Homo</i>	CCEGNICNLPLPRNETDAITFATTSPINQTNGHPRCMSVIVSCLWLWLGLML----	171
<i>Danio</i>	CCEGNICNLPLPRNETDAITFSTTSPINRSAQSTQTLPLLLLSVSITS-LMLHSIN	174

Abb. 4.5 Vergleich der Lypd6-Aminosäuresequenz von unterschiedlichen Spezies. Der Aminosäuresequenz des murinen Lypd6 (Ensembl ENSMUSP00000061578, 171 Aminosäuren) wurde die Lypd6-Sequenz von *Homo sapiens* (Ensembl ENSP00000334463, 171 Aminosäuren), und *Danio rerio* (Ensembl ENSDARP00000013064, 174 Aminosäuren) gegenübergestellt. Das Alignment wurde mit ClustalW angefertigt. Grau unterlegt sind die gemeinsamen Sequenzen zweier Spezies und schwarz unterlegt sind die allen 3 Spezies gemeinsamen Sequenzen. (

Die höchsten Homologien zwischen den genannten Lypd6-Proteinen liegen in Bereichen der jeweiligen Ly6-UPAR-Domänen.

Tab. 4.3 Ähnlichkeitsmatrix der Lypd6-Peptidsequenz unterschiedlicher Spezies.

	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Danio rerio</i>
<i>Mus musculus</i>	100 %	95,91 %	69,54 %
<i>Homo sapiens</i>	95,91 %	100 %	70,11 %
<i>Danio rerio</i>	69,54 %	70,11 %	100 %

4.4.2 Vergleich der Lypd6-Aminosäuresequenz mit anderen homologen Proteinen aus der Ly6-UPAR-Familie

Um erste Hinweise auf eine Funktion des Lypd6-Proteins zu erlangen, wurde dessen Aminosäuresequenz mittels Blastp-Analyse mit allen bekannten Mausproteinen verglichen. Auf diese Weise wurden die zu Lypd6 homologen Proteine 2310010M24Rik (Ensembl ENSMUSP00000028103), Plaur (Ensembl ENSMUSP00000002284), Ly6-A (Ensembl ENSMUSP00000023248), CD59a ('complement receptor 1-related gene/protein y, decay-accelerating factor'; ENSMUSP00000048041), Lynx1 (Ly6-Neurotoxin1; ENSMUSP00000023259) und Slurp1 ('secreted mammalian Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related protein1'; ENSMUSP00000023261) gefunden. Der Homologiegrad der gefundenen Proteine zu Lypd6 ist in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tab. 4.4 Ähnlichkeitsmatrix der Peptidsequenz von Lypd6 und der gefundenen homologen Proteine.

Homologie zu Lypd6 in Prozent	Protein
55,44 %	2310010M24Rik
30,00 %	Lynx1
27,59 %	Plaur
23,15 %	Ly6-A
22,72 %	Slurp1
19,79 %	CD59a

Der Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen mit Lypd6 wurde mittels ClustalW durchgeführt und ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Bei allen untersuchten Proteinen befinden sich identische Aminosäuren vor allem in gehäufter Form im Mittelteil der Aminosäuresequenzen. Die phylogenetische Analyse der Ly6-UPAR-Domänen von Lypd6 und der zu ihm homologen Proteine zeigt deutlich, dass die Sequenz-Ähnlichkeiten dieser Domäne am größten für Lypd6,

Lypd6	-----MEPSPALAWLLLLSLVADCLKAAQSRDFTVKDIIYLHP-----	38
2310010M24Rik	MCSSSFQRHTTLTCPIRVDRMLLLCHILAVTILQILIISENWVFAKNINFYNVRPP-----	55
Ly6-A	-----MDTSHTTKSCLLILLVALLCAER-----	23
Lynx1	-----MTHLLTVFLVALMGLPV-----	17
Plaur	SCTSLDQSCERGREQSLQCRYPTHECIEVVTLOSTERSLKDEDYTRGCGSLPGCPGTAGF	180
Slurp1	-----MTLRWAMWLLLLAAWSMGYG-----	20
CD59a	-----MRAQRGLILLLLLLLAVFCSTA-----	21
<hr/>		
Lypd6	-----STTPYPGGFKCFTCEKAADNYECNRWAPDIYCPRDT	74
2310010M24Rik	-----LDPTFPNSFKCFTCENAGDNYNENRWAEDKWCPQDT	92
Ly6-A	-----AQGLECYQCYGVPFETSC-----PSITCPYPD	50
Lynx1	-----AQALECHVCAYNGDNCFK-----PMRCPAMA	43
Plaur	HSNQTFFHLKCCNYTHCNGGPVLDLQSFPPNGFQCYSCGNNTLGCSSEEASLINCRGPM	240
Slurp1	-----EAFRCYTCEOPTAINSCKN-----IAQCKMED	47
CD59a	-----VSLTCYHCFQP-----VVSSCNMNS	41
<hr/>		
Lypd6	RYCYTQHTMEVTGNSISVTKRCVPLEECLS-TGCRDSEHEG---YKICTSCCEGNI CNLP	130
2310010M24Rik	QYCLTVHHFTSHGRSTSIKKKASKNECHF-VGCRHSRDSE---HTECRSCCEGMICNVE	148
Ly6-A	GVCVTQEAIVDSQTRKVKNNLCPLCPPIESMEILGTK---VNVKTSCCQEDLCNVA	107
Lynx1	TYCMTTRYFTP-YRMKVRKSCVP-----SCFETVIDGYSK---HASATSCCQYYLCN--	92
Plaur	NQCLVATGLDVLGNRSYTVRGCATASWQCG-SHVADSFPTH---LNVSVSCCHGSGCNSP	296
Slurp1	TACKT--VLETVEAAFPFNHSPMVTSCSSSCLATDPDGIG---VAHPVFCCFRDLCN--	100
CD59a	TCSPDQDSCLYAVAGMOVYQRCWKQSDCHGEIIMDQLEETK----LKFRCCQFNLCNKS	96
<hr/>		
Lypd6	LPRNETDATFATTSPINQTNHGHCVSVIVSCLWVWLGLTL-----	171
2310010M24Rik	LPTNHTNAVFAVMHAQRTSGSSVSSVSPYLLVLAWLFMLPLL---	191
Ly6-A	VP-----NGGSTWTMAGVLLFSLSSVLLQTLT---	134
Lynx1	-----GAGFATPVTALVPALLATFWSLL---	116
Plaur	TG-----GAPRPGPAQLSLIASLLLTGLWGVLLWT-	327
Slurp1	-----SGFPGFVAGL-----	110
CD59a	DG-----SLGKTPLLGTSVLVAILNLCFLSHL----	123

Abb. 4.6 Sequenzanalyse des LYPD6-Proteins und homologer Proteine aus der Ly6-UPAR-Superfamilie. Das Alignment wurde mit ClustalW angefertigt. Die Ly6-UPAR-Domäne ist als grauer Kasten unter den Aminosäuresequenzen dargestellt. Die für diese Domäne charakteristischen Cysteinreste sind schwarz unterlegt. Grau unterlegt sind Aminosäuren, die Lypd6 mit mindestens einem anderen Protein gemeinsam hat.

2310010M24Rik und Lynx1 sind (Abb. 4.7).

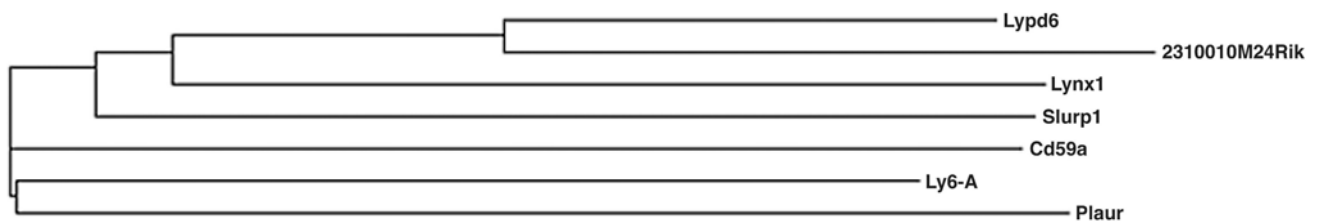


Abb. 4.7 Phylogenetische Analyse der Ly6-UPAR Domänen von Ly6d und der gefundenen homologen Proteine. Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen von Ly6d mit 2310010M24Rik, Lynx1, Slurp1, CD59a, Ly6-A und Plaur. Das Alignment wurde mit ClustalW angefertigt und ist hier als Phylogramm dargestellt.

4.5 Detailliertes Expressionsprofil des Ly6d-Gens in der Maus

Die endogene Expression des Ly6d-Gens wurde mit RT-PCR, *Real-time* PCR, *Northern-Blot* und *in situ*-Hybridisierung in unterschiedlichen murinen Geweben untersucht.

4.5.1 Qualitativer Nachweis der Ly6d-Expression durch RT-PCR

Die qualitative Expressionsanalyse der Ly6d-mRNA und 2310010M24Rik-mRNA zeigte Expression des Ly6d-Gens in Gehirn, Hoden, Ovar, Milz, Nieren und Skelettmuskulatur. In Dickdarm, Dünndarm, Herz, Lunge und den Nebennieren fiel die Ly6d-Expression unter die Nachweisgrenze. Das zu Ly6d paraloge Gen 2310010M24Rik zeigte hingegen eine weite Expression in Gehirn, Rückenmark, Ovar, Herz- und Skelettmuskulatur, Dünndarm, Leber, Milz, Nieren und Nebennieren. Lediglich in Dickdarm, Hoden und Lunge konnte keine Expression von 2310010M24Rik nachgewiesen werden. In Abbildung 4.8 ist die RT-PCR Analyse der Expression von Ly6d, 2310010M24Rik und β -Actin (als interne Kontrolle) in den untersuchten Organen dargestellt. Es wurden die unter 2.7 beschriebenen Primer LY6D, 2310010M24Rik und β -Actin verwendet.

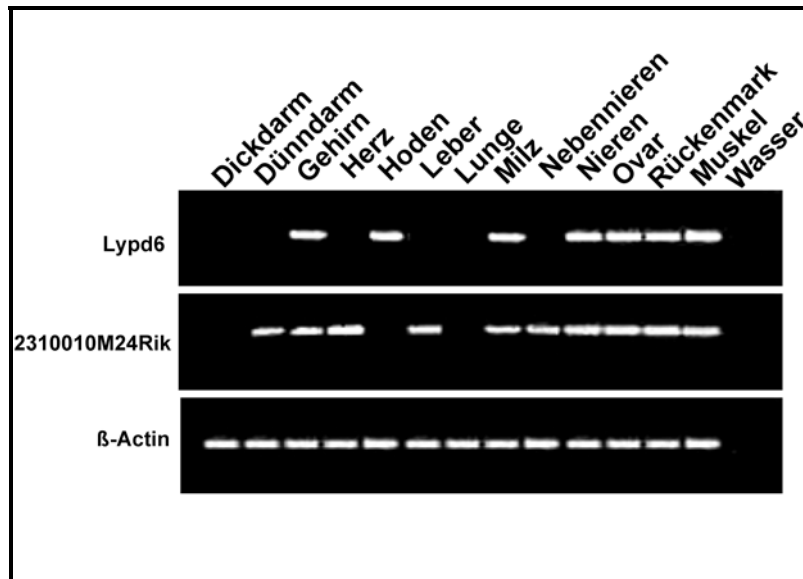


Abb. 4.8 Expression der Gene (A) *Lypd6* und (B) *2310010M24Rik* in Organen der adulten Maus. Analyse der Gesamt-RNA aus Dickdarm, Dünndarm, Gehirn, Herz, Hoden, Leber, Lunge, Milz, Nebennieren, Nieren, Ovar, Rückenmark und Skelettmuskulatur durch RT-PCR mit spezifischen Primern für *Lypd6*, *2310010M24Rik* und β -Actin.

4.5.2 Northern-Blot Analyse der *Lypd6*-Expression

Für die Untersuchung der Expression putativer Splicevarianten des *Lypd6*-Transkriptes wurden Gesamt-RNA-Präparationen unterschiedlicher muriner Gewebe mittels *Northern-Blot*

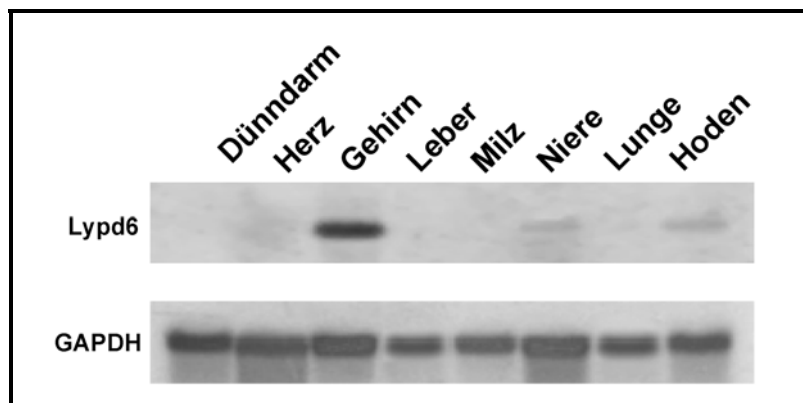


Abb. 4.9 Northern-Blot Analyse der *Lypd6*-Expression in Organen der adulten Maus. Analyse der Gesamt-RNA aus Dünndarm, Herz, Gehirn, Leber, Milz, Niere, Lunge und Hoden unter Verwendung spezifischer DIG-markierter cDNA-Sonden für den Nachweis von *Lypd6* und GAPDH.

Analysiert und eine *Lypd6*-Expression in Nieren und Hoden sowie eine sehr starke Expression im Gehirn nachgewiesen werden (Abb. 4.9). Splicevarianten konnten nicht gefunden werden. Die Expression in Dünndarm, Herz, Leber, Milz und Lunge fiel hier unter die Nachweisgrenze. Es wurden die unter 2.11 beschriebenen Sonden *Lypd6*-DIG und GAPDH-DIG (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; interne Kontrolle) verwendet.

4.5.3 Quantifizierung der Lypd6-Expression durch *Real-time* PCR

Die quantitative Analyse der Lypd6-Expression in Hirn, Milz, Niere, Skelettmuskulatur, Testis, Leber, Ovar und Rückenmark zeigte eine starke Anreicherung der Lypd6-mRNA in Gehirn und Rückenmark der untersuchten Tiere (Abb. 4.10). Einfaktorielle Varianzanalyse der Expressionsdaten ergab signifikante Unterschiede in der Expression der Lypd6-mRNA in den untersuchten Organen ($F_{9,40} = 202,7$; $P < 0,01$). Die Lypd6-Expression in Gehirn und Rückenmark war signifikant stärker als in allen anderen untersuchten Organen. Um einiges geringer als in Gehirn und Rückenmark war die Expression in Niere, Hinterwurzelganglien, Trigeminalganglien, Muskel und den Gonaden. Am geringsten fiel die Expression in Milz und Leber aus. Es wurden die unter 2.7 beschriebenen Primer Lypd6q und TBP (*TATA Binding Protein*, interne Kontrolle) verwendet.

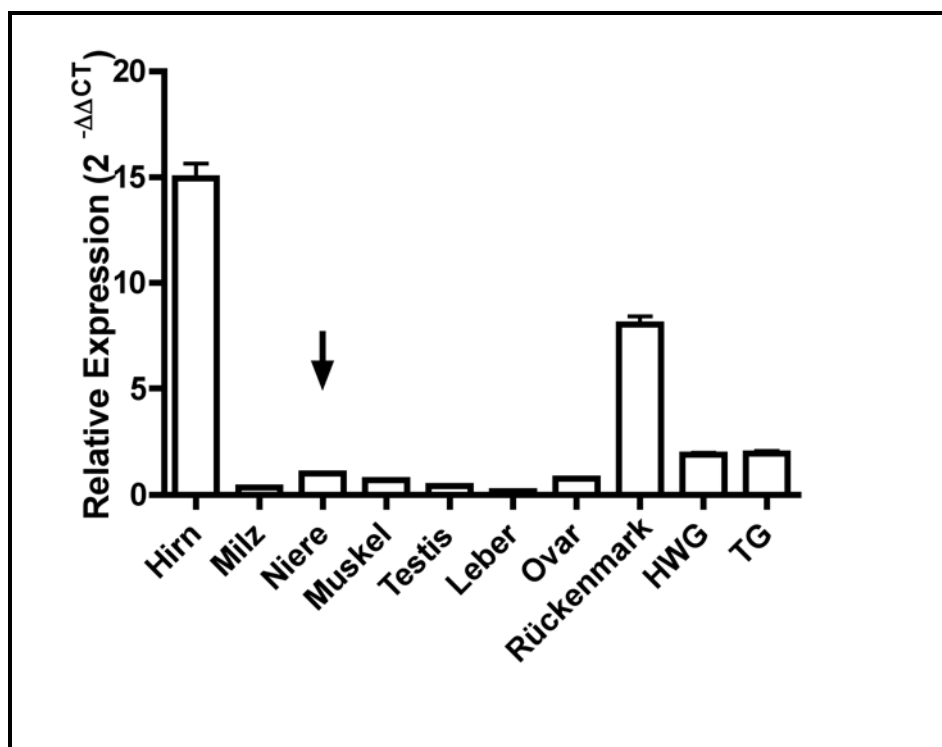


Abb. 4.10 Quantifizierung der Expression des Lypd6-Gens in Organen der adulten Maus. Quantitative Analyse der Gesamt-RNA aus Gehirn, Milz, Niere, Skelettmuskulatur, Testis, Leber, Ovar, Rückenmark, Hinterwurzelganglien (HWG) und Trigeminalganglien (TG) durch Real time RT-PCR mit spezifischen Primern für Lypd6 und TBP. Die Messwerte wurden auf die Expression von TBP hin standardisiert. Es wurden Organe von fünf Tieren verwendet ($n = 5$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der relativen Expression von Lypd6 nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Alle Expressionsdaten sind auf die ΔCT -Werte der Lypd6-Expression in der Niere normalisiert. Mit einem Pfeil hervorgehoben ist das Referenzorgan für die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Bestimmung der Expressionsdaten.

4.5.4 Histologischer Nachweis der Lypd6-Expression

Alle *in situ*-Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin-markierten spezifischen (Ribo Lypd6 DIG Antisense) und nicht-bindenden (Ribo Lypd6 DIG Sense) cRNA-Sonden durchgeführt (siehe 2.11).

4.5.4.1 Zeitverlauf der Expression im Mausembryo

Die Expression der Lypd6-mRNA konnte deutlich während der Embryonalentwicklung von Entwicklungsstadium E11,5 – E18,5 im sich entwickelnden Zentralnervensystem nachgewiesen werden. Die Expression erstreckte sich hauptsächlich auf Bereiche, aus denen später in der Entwicklung Neocortex, Diencephalon und Rückenmark hervorgehen. Im Stadium E11,5 (Abb. 4.11 A) konnte die Lypd6-Expression in den Arealen um das Groß- und Mittelhirnbläschen sowie um den vierten Ventrikel gezeigt werden. Besonders deutlich fiel der Nachweis im Bereich um das Großhirnbläschen (VsG) aus. Zum Entwicklungszeitpunkt E12,5 (Abb. 4.11 B) kam die Expression im Bereich um den lateralen (LV) und um den dritten Ventrikel (3V) dazu. Zum Zeitpunkt E13,5 (Abb. 4.11 C) verstärkte sich die Expression deutlich im Mantelbereich des *Neopalliums* (NP) und im germinalen Neuroepithel (GN). Aus dem *Neopallium* entwickelt sich später der Neocortex und im germinalen Neuroepithel sind Vorläuferzellen angesiedelt, aus denen die Neuronen des Zentralnervensystems hervorgehen. In den Stadien E14,5 und E15,5 (Abb. 4.11 D; Abb. 4.11 E) konnte die Lypd6-Expression unverändert im germinalen Neuroepithel und im *Neopallium* gezeigt werden. Zu dieser Expression kam im Stadium E16,5 (Abb. 4.11 F) eine Expression im Diencephalon und der Neuronenschicht der Retina hinzu. Dieses Expressionsmuster veränderte sich zum Zeitpunkt E17,5 (Abb. 4.11 G) nicht wesentlich. Die Expression im Diencephalon war in diesem Entwicklungsstadium jedoch deutlicher ausgeprägt und dazu wurde in diesem Stadium das Lypd6-Transkript auch im Rückenmark stärker exprimiert. Hinzu kam die Expression des Lypd6-Transkripts im *Lobus olfactorius*. Zum Entwicklungszeitpunkt E18,5 (Abb. 4.11 H) änderte sich dieses Expressionsmuster nicht wesentlich. Die Lypd6-Expression wurde in *Neopallium*, germinalem Neuroepithel, *Lobus olfactorius* und Diencephalon nachgewiesen. Als Kontrolle wurden Schnitte mit einer DIG-markierten cRNA-Sonde hybridisiert, die komplementär zur oben verwendeten spezifischen Sonde war und somit nicht mit der Lypd6-mRNA hybridisieren kann. Mit dieser Kontrollsonde waren keine Signale nachweisbar.

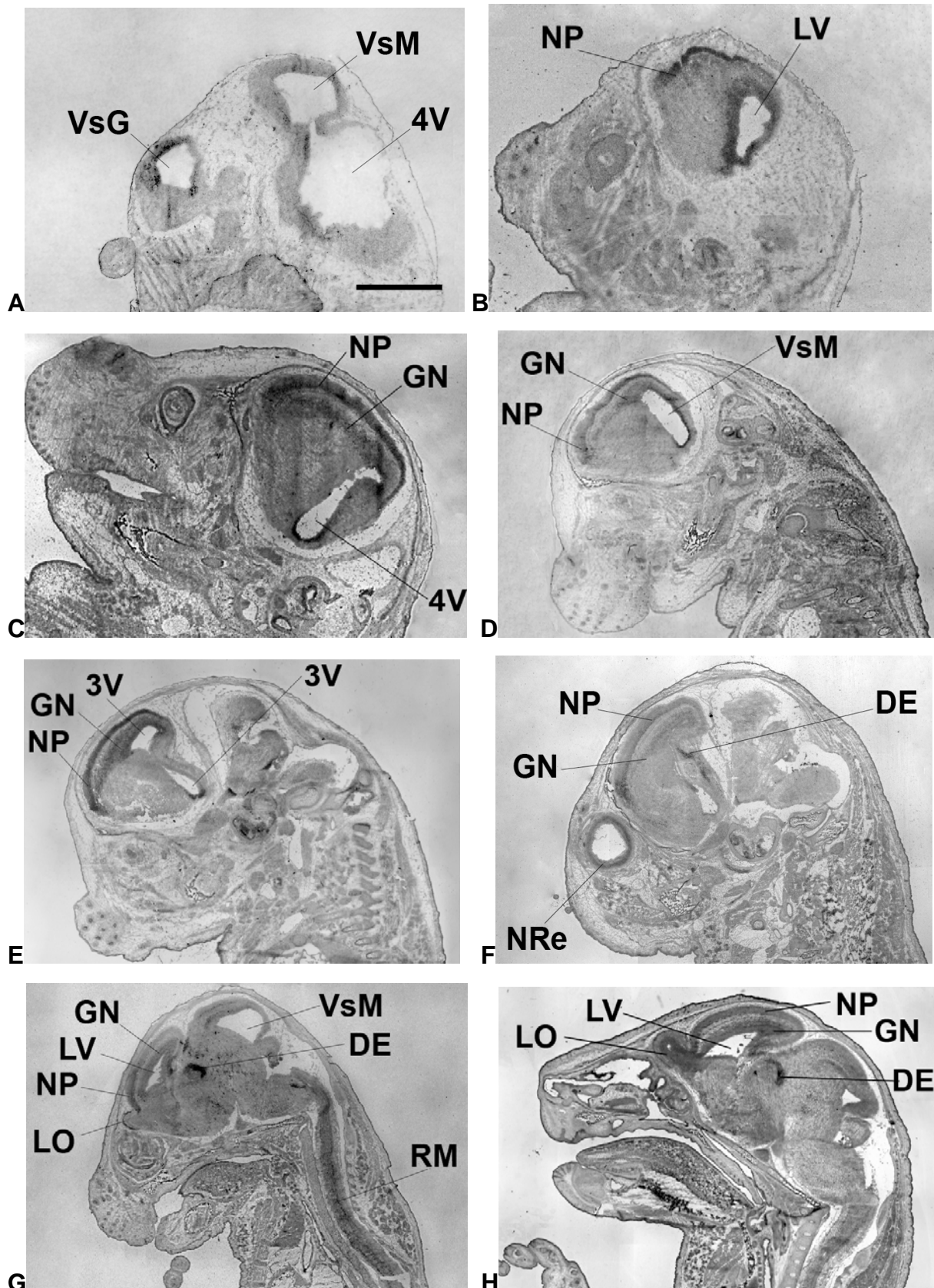


Abb. 4.11 Expression der Lypd6-mRNA im Mausembryo zum Entwicklungszeitpunkt (A) E11,5; (B) E12,5; (C) E13,5; (D) E14,5; (E) E15,5; (F) E16,5; (G) E17,5 und (H) E18,5. *In situ* Hybridisierung mit Lypd6-spezifischer, DIG-markierter cRNA-Sonde auf 12 µm Kryoschnitten. 3V = Dritter Ventrikel; 4V = Vierter Ventrikel; DE = *Diencephalon*; GN = *Germinales Neuroepithel*; LO = *Lobus olfactorius*; NP = *Neopallium*; NRe = *Neuronenschicht Retina*; RM = *Rückenmark*; VSG = *Großhirnblässchen*; VSM = *Mittelhirnblässchen*. Der Balken entspricht 500 µm.

4.5.4.2 Expression im adulten Maushirn

Im adulten Maushirn konnte die *Lypd6*-mRNA hauptsächlich im *Cortex* und im Diencephalon nachgewiesen werden (Abb. 4.12).

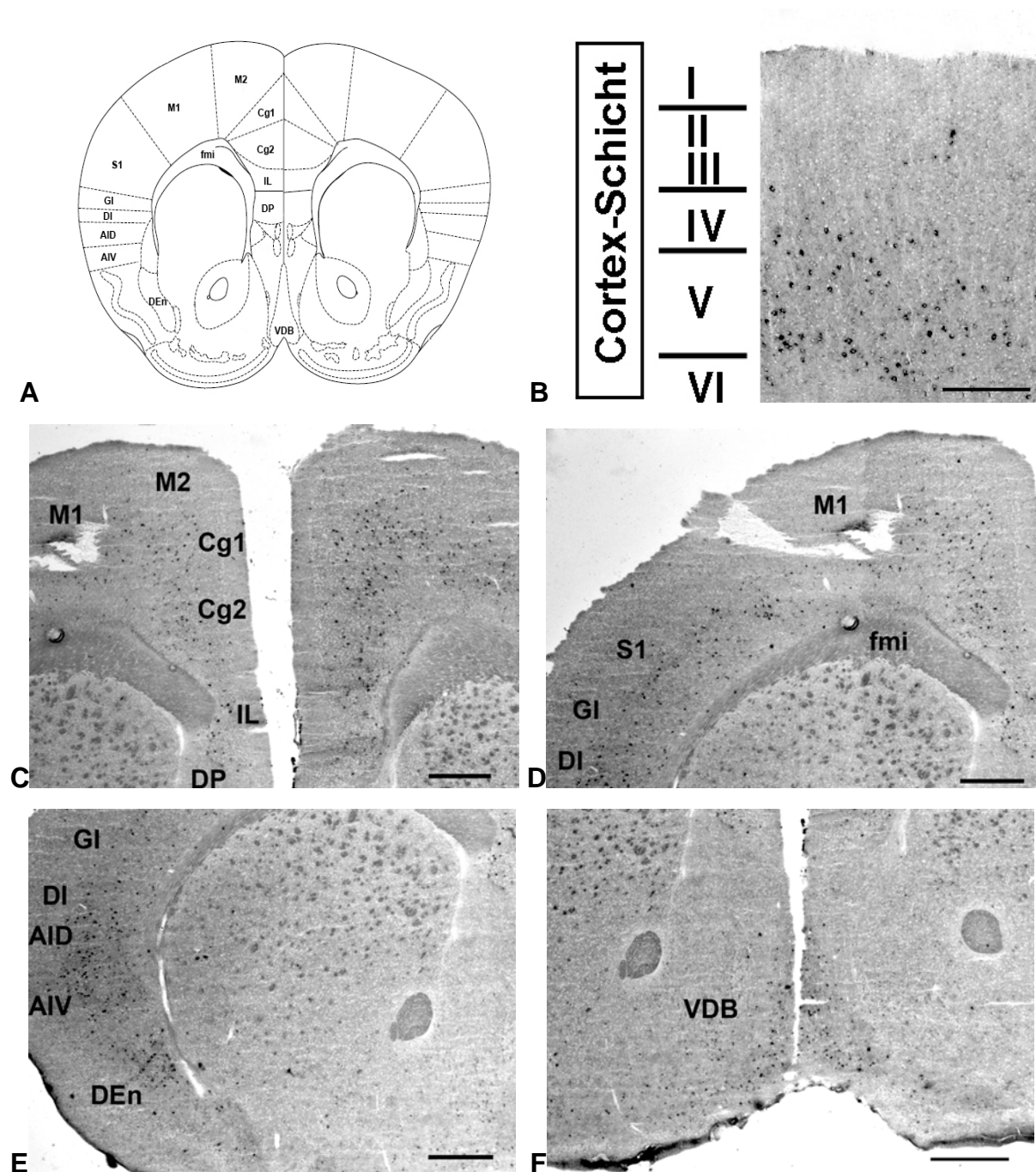


Abb. 4.12 Expression der *Lypd6*-mRNA im adulten Maushirn, präfrontaler *Cortex* (Bregma 1.34). *In situ* Hybridisierung mit *Lypd6*-spezifischer, DIG-markierter cRNA-Sonde auf 12 µm Kryoschnitten. (A) Schematische Übersicht; (B), (C), (D) und (E) Expression im *Cortex*; (F) Subkortikale Expression. Balken = 300 µm. AID = *Cortex insularis agranularis* (dorsal); AIV = *Cortex insularis agranularis* (ventral); Cg1 = Cingulärer Cortex (Area 1); Cg2 = Cingulärer Cortex (Area 2); DEn = *Nucleus endopiriformis* (pars dorsalis); DI = *Cortex insularis dysgranularis*; DP = Peduncular cortex (dorsal); fmi = *Forceps minor* (corpus callosum); GI = *Cortex insularis granularis*; IL = *Cortex infralimbicus*; M1 = Primärer motorischer Cortex; M2 = Sekundärer motorischer Cortex; S1 = Primärer somatosensorischer Cortex; VDB = *Nucleus diagonalis* (pars verticalis).

Im *Cortex* war die Expression auf die tieferen Zellschichten begrenzt. Hier wurde *Lypd6* hauptsächlich in der *Lamina ganglionaris*, in der *Lamina multiformis* detektiert und in der *Lamina granularis externa* nachgewiesen (Abb. 4.12 B). In der *Lamina ganglionaris* befinden sich große Pyramidenzellen, die efferent mit Neuronen im Thalamus und afferent mit anderen kortikalen Neuronen verbunden sind. In der *Lamina multiformis* sind lockere Zellformationen angesiedelt, die efferent mit dem Hirnstamm und afferent mit anderen kortikalen Neuronen verbunden sind, und in der *Lamina granularis externa* befinden sich Sternzellen, die hauptsächlich mit primären Afferenzen aus dem Thalamus verbunden sind. Sie bilden intrakortikale Verbindungen zu Neuronen der *Lamina pyramidalis* aus. Die Sternzellen gelten als intrakortikale Schalteinheiten, die Signale aus dem Thalamus zu pyramidalen Zellen aus der *Lamina pyramidalis* weiterleiten.

Die kortikale Expression der *Lypd6*-mRNA erstreckte sich bandförmig über den gesamten *Cortex*. Abbildung 4.12 zeigt beispielhaft die Expression im präfrontalen *Cortex*. Hier umfasst der Expressionsbereich den infralimbischen, den cingulären und den motorischen *Cortex* (Abb. 4.12 C), den sensorischen *Cortex* (Abb. 4.12 D) sowie den insulären *Cortex* und den *Nucleus endopiriformis* (Abb. 4.12 E). Subkortikal ist im präfrontalen *Cortex* eine Expression im *Nucleus diagonalis* nachweisbar (Abb. 4.12 F). Am deutlichsten fiel die Expression von *Lypd6* im Diencephalon aus. Im medialen Thalamus war das Transkript im *Nucleus paraventricularis*, im zentro-medialen, zentro-lateralen und intermediodorsalen Thalamus stark exprimiert (Abb. 4.13 A).

Eine starke Expression konnte zudem im medialen Hypothalamus sowie im Bereich des *Nucleus reuniens* im Thalamus nachgewiesen werden (Abb. 4.13 B).

Auch hier waren mit der Sense-Kontrollsonde keine Signale nachweisbar.

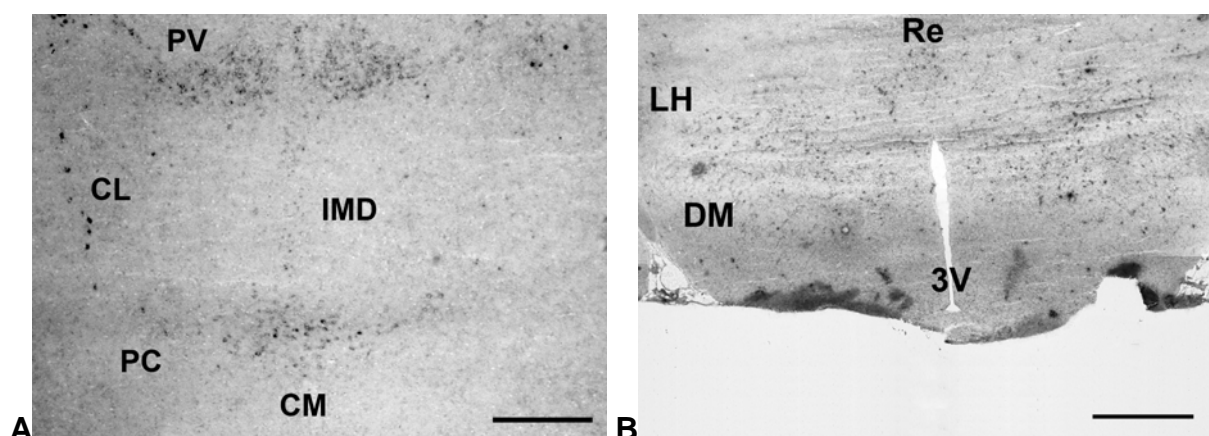


Abb. 4.13 Expression der *Lypd6*-mRNA im Diencephalon der adulten Maus. *In situ* Hybridisierung mit *Lypd6*-spezifischer, DIG-markierter cRNA-Sonde auf 12 µm Kryoschnitten. (A) Medialer Thalamus; (B) Hypothalamus. Balken = 300 µm. 3V = Dritter Ventrikel; CL = *Nucleus centrolateralis thalami*; CM = *Nucleus centromedialis thalami*; DM = *Nucleus dorsomedialis hypothalami*; IMD = *Nucleus intermediodorsalis thalami*; LH = *Regio lateralis hypothalami*; PC = *Nucleus paracentralis thalami*; PV = *Nucleus paraventricularis thalami*; Re = *Nucleus reuniens*.

4.6 Überexpression von Lypd6 in Zelllinien und transgenen

Mauslinien

Für die Überexpressionsexperimente wurde ein cDNA-basierter Expressionsvektor kloniert, der den ORF des Lypd6-Gens zusammen mit dessen endogener Konsensussequenz für den Translationsstart enthielt. An den C-Terminus des Lypd6-Proteins wurde ein Hämagglutinin-Epitop ('HA') fusioniert, da sich am N-Terminus die Sequenz des Signalpeptids für die Sekretion befindet. Als Polyadenylisierungssignal wurde die DNA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons ausgewählt, da diese die Stabilität der polyA-mRNA deutlich steigert. Für die Überexpression von Lypd6 in Neuro-2a Zellen und in Nervenzellen transgener Tiere wurde der Neuronen-spezifische Synapsin1-Promotor aus der Ratte verwendet. Synapsin ist ein Phosphoprotein, das selektiv an kleine synaptische Vesikel der präsynaptischen Endigung von Neuronen bindet (Schoch et al., 1996). Zusätzlich wurde für eine Überexpression in CHO-K1 Zellen der humane EF1 α -Promotor (*'Polypeptide elongation factor'*) eingesetzt. EF1 α ist ein ubiquitäres Protein des Translationsapparates, das in allen somatischen Zellen vorhanden ist (Bischoff et al., 2000). In Abbildung 4.14 sind Ausschnitte aus den Expressionsvektoren in linearisierter Form dargestellt. Der Ausschnitt des Synapsin-Promotor-Konstruktes entspricht dem Fragment, das später für die Erzeugung der transgenen Mäuse eingesetzt wurde.

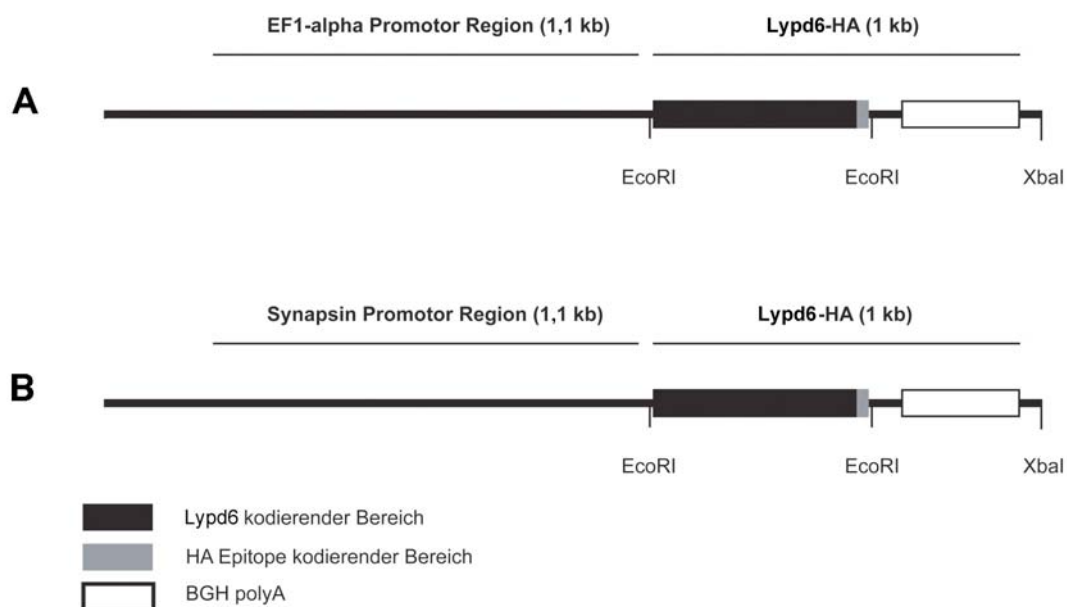


Abb. 4.14 Grafische Darstellung der Konstrukte für die Überexpression des Lypd6 HA-Fusionsproteins. (A) Konstrukt zur Überexpression in allen somatischen Zellen (EF1 α -Promotor). (B) Konstrukt zur Überexpression in Neuronen (Synapsin1-Promotor). Die Promotoren sind jeweils als schwarze Linien und das Fusionsprotein als schwarz-grauer Balken dargestellt. Das Polyadenylisierungssignal ist als weißer Balken markiert. Eingetragen sind Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen *EcoRI* und *XbaI*.

4.6.1 Nachweis der transienten Überexpression in Neuro-2a und CHO-K1 Zellen

Um die subzelluläre Lokalisierung von Lypd6 zu analysieren, wurden eine neuronale Zelllinie (Neuro-2a) mit dem Synapsin1-Promotor Expressionskonstrukt und eine nicht-neuronale Zelllinie (CHO-K1) mit dem EF1 α -Promotor Expressionskonstrukt transient transfiziert. Die Analyse der Expression erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. In transfizierten Neuro-2a und CHO-K1 Zellen konnte jeweils das Lypd-HA-Transkript mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Hierfür wurde ein spezieller *Antisense*-Primer verwendet, der nur an die Nukleotidsequenz des HA-Epitops bindet. Der *Sense*-Primer war der Lypd6 Kozak-Primer (siehe 2.7). Diese Primerkombination weist demnach den gesamten offenen Leserahmen des Lypd6 HA-Transgens nach. Als interne Kontrolle wurden β -Actin-Primer verwendet.

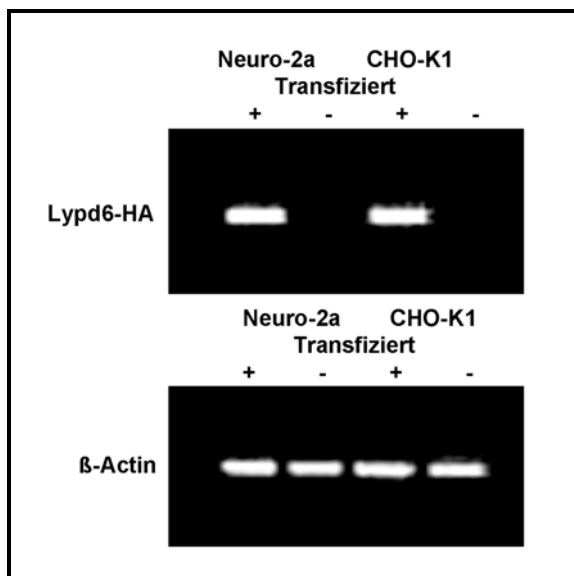


Abb. 4.15 Transiente Lypd6-HA Expression in Neuro-2a und CHO-K1 Zellen. Analyse der Gesamt-mRNA von transfizierten (+) und nicht transfizierten (-) Neuro-2a und CHO-K1 Zellen durch RT-PCR mit spezifischen Primern für Lypd6-HA und β -Actin.

Für den immunologischen Nachweis der zellulären Lokalisierung von Lypd6 wurde ein polyklonaler Anti-HA Antikörper aus dem Kaninchen (Sigma-Aldrich) zusammen mit einem Anti-Kaninchen Alexa488 Antikörper (für CHO-K1 Zellen) oder einem Anti-Kaninchen Cy3 Antikörper (für Neuro-2a Zellen) verwendet. In transient transfizierten CHO-K1 (Abb. 4.16 A/B) und Neuro-2a Zellen (Abb. 4.16 C/D) wurde das Lypd6-HA Fusionsprotein perinukleär im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen. Die Vitalität der transfizierten Zellen wurde jeweils mittels DAPI-Färbung überprüft (Abb. 4.16 B/D).

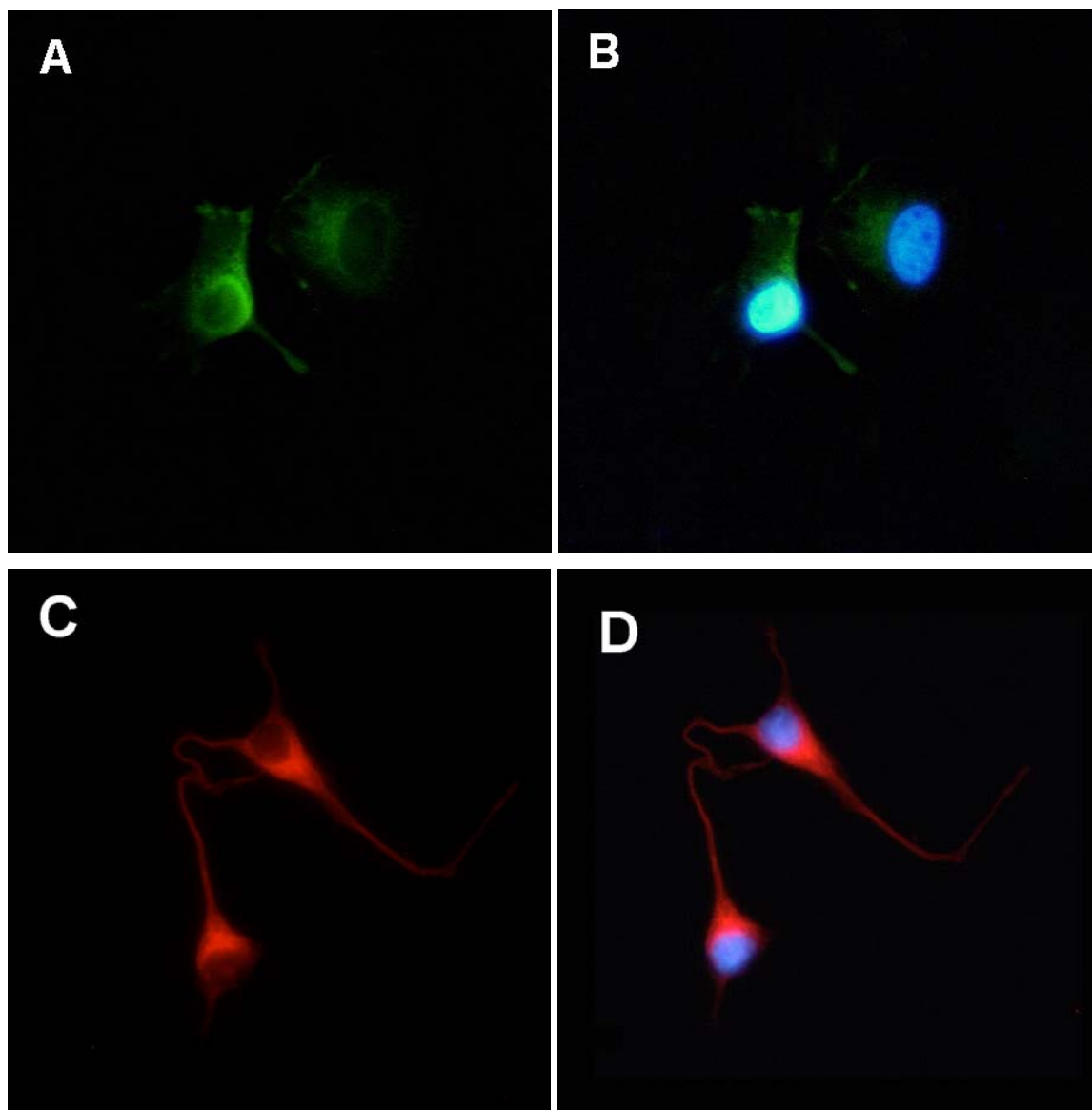


Abb. 4.16 Lokalisierung des Lypd6-HA Fusionsproteins in CHO-K1 und N2A-Zellen. (A, B) Transiente Transfektion von CHO-K1 Zellen mit dem EF1 α -Promotor Expressionskonstrukt. (C, D) Transiente Transfektion von N2A-Zellen mit dem Synapsin1-Promotor Expressionskonstrukt. Transfizierte Zellen wurden gewaschen, fixiert, permeabilisiert und mit einem Anti-HA Antikörper inkubiert. CHO-K1 Zellen (A, B) wurden danach mit einem Alexa Fluor 488 konjugierten Antikörper (grün) und Neuro-2a Zellen (C, D) mit einem Cy3 konjugierten Antikörper inkubiert (rot). Alle Zellen wurden mit DAPI gefärbt (B, D). Die Bilder wurden bei 63facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop aufgenommen.

4.6.2 Herstellung von transgenen Mäusen mit Lypd6-Überexpression

Um die Funktion von Lypd6 im Nervensystem zu analysieren wurden transgene Tiere mit neuronaler Überexpression von Lypd6 hergestellt. Dazu wurde das Synapsin1-Promotor Expressionskonstrukt mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und das Restriktionsfragment aus dem Gel isoliert. Das Fragment wurde gefällt und in steril filtertem TE-Puffer aufgenommen. Dieses Fragment enthielt lediglich den

Promotor, die Transgensequenz und das Polyadenylierungssignal. Aus der Injektion dieses Fragments in die Vorkerne befruchteter Oozyten und deren Retransfer in pseudoschwangere Ammenmütter resultierten 78 putativ transgene Mäuse. Die Genotypisierung dieser Mäuse ergab, dass drei Männchen transgen waren. Im genomischen Lokus des murinen *Lypd6*-Gens befinden sich *EcoRI*-Schnittstellen, zwischen denen sich ein ca. 4300 Basenpaare langes Fragment befindet, dass sowohl in Wildtyptieren als auch in transgenen Tieren mit der *Lypd6*-DIG-Sonde nachgewiesen wurde (Abb. 4.17). Zusätzlich wurde mit dieser Sonde in transgenen Tiere ein 600 Basenpaare langes *EcoRI*-Transgenfragment detektiert. Außerdem konnten zusätzliche Fragmente in transgenen Tieren nachgewiesen werden, die häufig dadurch entstehen, dass bei der Pronukleusinjektion von DNA mehrere Kopien des Transgens als 'head-to-tail' Konkatomere in das Genom integrieren.

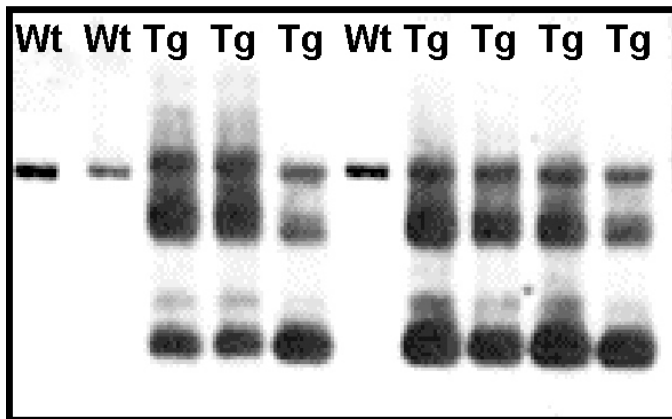


Abb. 4.17 Genotypisierung der erzeugten transgenen Mäuse. *Southern-Blot* Analyse der genomischen DNA von Wildtyp- und transgenen Mäusen. Alle DNA-Proben wurden mit *EcoRI* verdaut. Die Bande des *Lypd6* Gens läuft bei 4300 bp und die Transgenbande bei 600 bp. Zusätzlich ist unterhalb der Wildtypbande eine Konkatomerbande zu erkennen. Wt = Wildtyp; Tg = Transgen.

4.6.3 *Lypd6*-Überexpression in den Synapsin-LYPD6 Mauslinien

Alle 3 transgenen Tiere konnten verpaart werden und erzeugten transgenen Nachwuchs. Somit konnten 3 Linien etabliert werden, die nach der Ohrmarkennummer der Liniengründer ('*Founder*') benannt wurden. Es waren dies die Linien D17, D67 und D774.

4.6.3.1 Nachweis der *Lypd6*-HA-Expression durch RT-PCR

Die *Lypd6*-HA-Expression wurde wie in 4.6.2 beschrieben in Wildtyptieren und in den Linien D17, D67 und D774 mittels RT-PCR untersucht. Insgesamt wurden 5 Wildtyptiere und pro Linie 5 transgene Tiere analysiert. Es wurde RNA aus Leber, Gehirn, Rückenmark und Hoden für die RT-PCR eingesetzt. In zwei der drei Mauslinien fanden wir Expression des Transgens. In den Linien D17 und D67 konnte das *Lypd6*-HA-Transkript deutlich in Gehirn

und Rückenmark sowie etwas schwächer im Hoden nachgewiesen werden, aber nicht in der Leber. In der Linie D774 und in den Wildtypen konnte das Lypd6-HA-Transkript in keinem der untersuchten Organe nachgewiesen werden (Abb. 4.18).

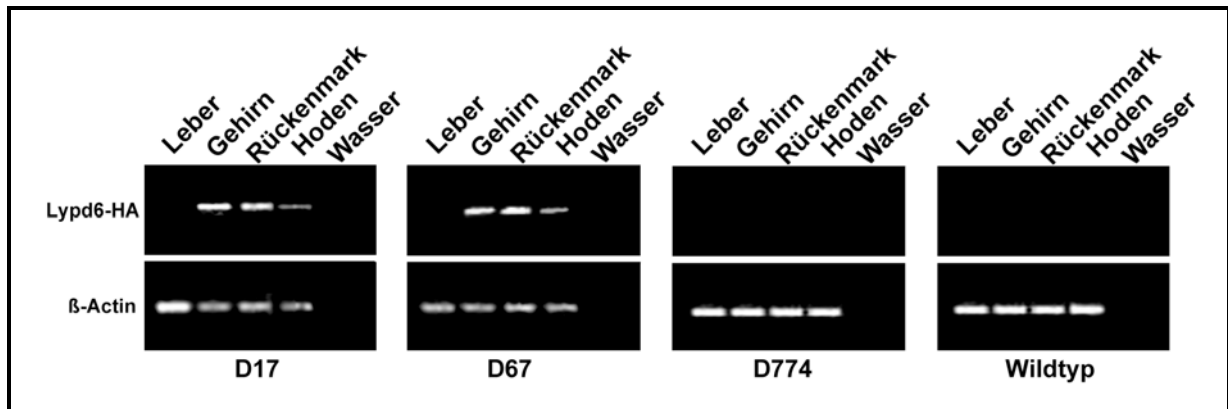


Abb. 4.18 Lypd6-HA Expression in Synapsin-LYPD6 Mauslinien und Wildtypen. Analyse der Gesamt-RNA aus Leber, Gehirn, Rückenmark und Hoden durch RT-PCR mit spezifischen Primern für Lypd6-HA und β -Actin. Expression in Wildtypen und den Synapsin-Lypd6 Mauslinien D17, D67 und D774.

4.6.3.2 Histologischer Nachweis der Lypd6-Überexpression durch *in situ*-Hybridisierung

Mittels *in situ*-Hybridisierung an 12 μ m dicken Coronalschnitten von Gehirnen adulter Mäuse wurde die Lokalisation der Lypd6-Überexpression in transgenen Tieren der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie untersucht. In den transgenen Tieren konnte eine quasi ubiquitäre Expression des Lypd6-Transkripts im gesamten Hirn nachgewiesen werden (Abb. 4.19 A). Es wurden die unter 2.11 beschriebenen Sonden Ribo Lypd6 DIG Sense und Ribo Lypd6 DIG Antisense verwendet. Mit der Sense-Kontrollsonde hybridisierte Schnitte wiesen keine nachweisbaren Signale auf.

4.6.3.3 Quantifizierung der Lypd6-Überexpression durch *Real time* PCR

Im Vergleich mit den Wildtypen konnte in Hirn, Rückenmark, Trigeminall- und Hinterwurzelganglien der Synapsin-Lypd6 transgenen Tiere eine sehr deutlich gesteigerte Expression von Lypd6 gezeigt werden (Abb. 4.19 B). Es wurden die unter 2.7 beschriebenen Primer Lypd6q und TBP verwendet.

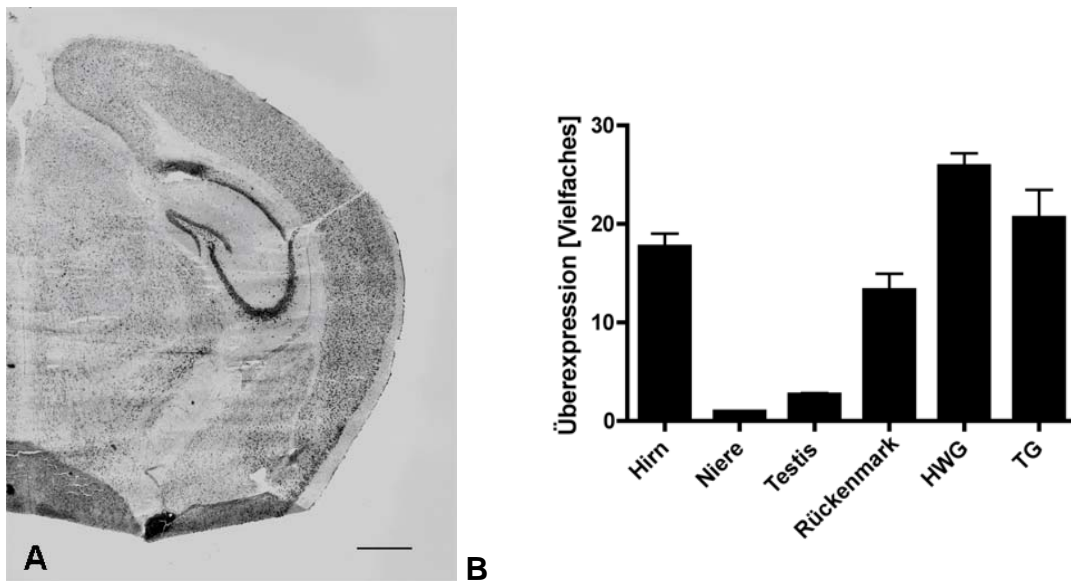


Abb. 4.19 Lypd6-Überexpression in Synapsin-LYPD6 transgenen Tieren der Mauslinie D17. (A) *In situ*-Hybridisierung auf coronalem 12 µm Kryoschnitt eines transgenen Maushirns mit Lypd6-spezifischer, DIG-markierter cRNA-Sonde. Balken = 500 µm. (B, C) Quantitative Analyse der Gesamt-RNA aus (B) Hinterwurzelganglien (HWG) und (C) Trigeminalganglien (TG) von transgenen und Wildtyp-Tieren durch Real time RT-PCR mit spezifischen Primern für Lypd6 und TBP. Die Messwerte wurden auf die Expression von TBP hin standardisiert. Es wurden Präparationen von je vier Tieren verwendet (n = 4). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expression von Lypd6 und die Standardfehler der Mittelwerte. Die relative Expression wurde als Vielfaches der Expression in den Wildtyp-Hinterwurzelganglien berechnet.

4.6.3.4 Nachweis des Lypd6 HA-Fusionsproteins in Lypd6-Transgenen

Für den Nachweis des Lypd6 HA-Fusionsproteins wurden Proteinlysate aus Hirn, Hoden und Rückenmark von Synapsin-Lypd6 Tieren der Mauslinie D17 und Wildtyp-Tieren hergestellt und für die Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Anti-HA-Antikörper (Covance) eingesetzt. Nur in Immunpräzipitaten aus Hirn- und Rückenmarkproteinpräparationen von transgenen Tieren konnte das Lypd6-HA-Fusionsprotein im *Western-Blot* mit einem polyklonalen Anti-HA-Antikörper (Abcam) nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Die nachgewiesene Proteinbande hatte eine Größe von ca. 20 kDa, was der theoretisch vorhergesagten Größe des Fusionsproteins entspricht.

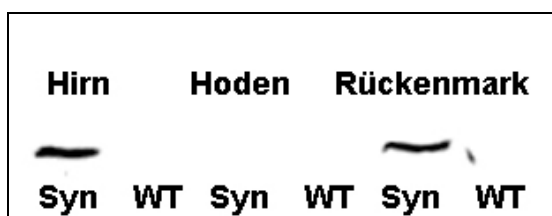


Abb. 4.20 Expression des Lypd6-HA-Fusionsprotein in Synapsin-LYPD6 transgenen Tiere der Mauslinie D17. *Western-Blot*-Analyse der Immunpräzipitate von Gesamtproteinextrakten aus Hirn, Hoden und Rückenmark von Transgenen und Wildtyp-Tieren mit HA-Antikörper.

4.7 Verhaltensanalyse der transgenen Synapsin-Lypd6 Mauslinien

4.7.1 Allgemeine Charakterisierung

4.7.1.1 Allgemeiner Verhaltenstest nach Irwin

Zur Untersuchung auf gravierende neurologische Verhaltensauffälligkeiten wurden transgene Tiere und Wildtypiere mit dem allgemeinen Verhaltenstest nach Irwin analysiert. Es konnte jedoch in keiner der Untersuchungskategorien ein statistisch signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen Tieren der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie und Wildtypieren festgestellt werden. Da dieser Test dazu konzipiert wurde nur extrem schwerwiegende Verhaltensphänotypen zu erfassen, und die am stärksten exprimierende Synapsin-Lypd6 Mauslinie keine Auffälligkeiten in diesem Test zeigte, wurde auf eine Analyse der anderen Mauslinien verzichtet.

4.7.1.2 Lokomotorisches Verhalten im Offenfeld

Um zu analysieren, ob die Synapsin-Lypd6 Mauslinien ein verändertes Bewegungs- und Explorationsverhalten zeigen, wurde deren Verhaltensreaktion auf eine für sie neuartige Umgebung im Offenfeld untersucht. Hierbei fanden wir, dass die Überexpression des Lypd6-Gens in den transgenen Mauslinien zu einem stark gesteigerten lokomotorischen Verhalten im Offenfeld führte (Abb. 4.21). Die Analyse der im Offenfeld erhobenen Parameter mittels einfaktorieller ANOVA ergab einen statistisch signifikanten Effekt der Überexpression auf Bewegungszeit ($F_{3,28} = 8,468$; $P < 0,01$), zurückgelegte Distanz ($F_{3,28} = 10,08$; $P < 0,01$), mittlere Geschwindigkeit ($F_{3,28} = 6,099$; $P < 0,01$) und Zeit mit Hyperaktivität ($F_{3,28} = 10,08$; $P < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche der Messwerte zeigten eine signifikante Steigerung der Bewegungszeit für Synapsin-Lypd6 D67-Tiere ($P < 0,05$) und Synapsin-Lypd6 D17-Tiere ($P < 0,01$; Abb. 4.21 A), eine signifikante Steigerung der zurückgelegten Distanz für Synapsin-Lypd6 D67-Tiere und Synapsin-Lypd6 D17-Tiere (jeweils $P < 0,01$; Abb. 4.21 B), eine signifikante Steigerung der mittleren Geschwindigkeit für Synapsin-Lypd6 D17-Tiere ($P < 0,01$; Abb. 4.21 C) und eine signifikante Steigerung der Hyperaktivität für Synapsin-Lypd6 D67-Tiere und Synapsin-Lypd6 D17-Tiere (jeweils $P < 0,01$; Abb. 4.21 D). Für das explorative lokomotorische Verhalten, gemessen an der Anzahl der Aufrichtungen, konnte kein signifikanter Effekt des Genotyps nachgewiesen werden. Für die Synapsin-Lypd6 D17-Tiere konnte lediglich ein Trend zu einer geringeren Anzahl von Aufrichtungen festgestellt werden (Abb. 4.21 E).

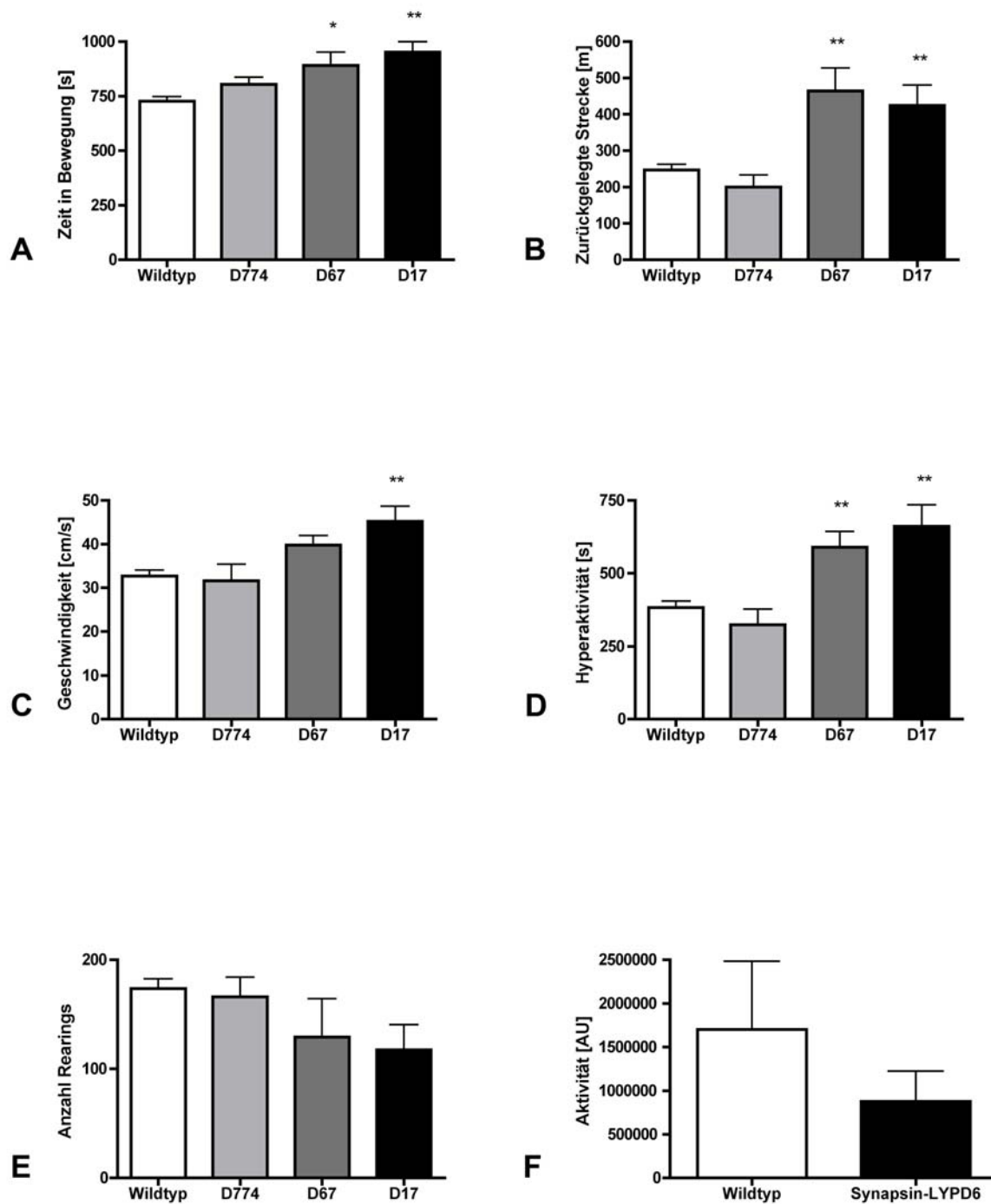


Abb. 4.21 Lokomotorisches Verhalten der Synapsin-Lypd6 Mauslinien und Wildtypiere in Offenfeld und Heimatkäfig. Analyse von Wildtypieren (weiße Balken) und den drei transgenen Synapsin-Lypd6 Mauslinien D774 (hellgraue Balken), D67 (dunkelgraue Balken) und D17 (schwarze Balken) in Offenfeld (A, B, C, D und E) und Heimatkäfig (F). Dargestellt sind die Offenfeld-Aktivitätsparameter (A) Zeit in Bewegung, (B) Zurückgelegte Strecke, (C) Mittlere Geschwindigkeit, (D) Hyperaktivität und (E) Anzahl der Rearings. Diese Parameter wurden als summierte Aktivität nach 20 Minuten im Offenfeld erhoben. (F) zeigt die summierte Aktivität der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie nach 48 Stunden im Heimatkäfig. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Offenfeld: n (Wildtyp) = 8, n (Linie D774) = 8, n (Linie D67) = 8 und n (Linie D17) = 8. Heimatkäfig: n (Wildtyp) = 8 und n (Linie D17) = 8. * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtypieren ('Tukey's Multiple Comparison Test').

4.7.1.3 Heimatkäfig-Aktivität

Um zu untersuchen, ob die Überexpression des Lypd6-Gens auch Auswirkungen auf die basale lokomotorische Aktivität hat, wurde das Bewegungsverhalten der transgenen Tiere im Heimatkäfig analysiert. Aufgrund der geringen Unterschiede im lokomotorischen Verhalten zwischen den Mauslinien D17 und D67 wurden im Heimatkäfig nur Tiere der Linie D17 analysiert. Zwischen der Heimatkäfig-Aktivität von transgenen Tieren und Wildtyptieren konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 4.21 F). Für die transgenen Tiere konnte lediglich ein Trend zu einer geringeren Heimatkäfig-Aktivität festgestellt werden.

4.7.2 Aggressives Verhalten

Um zu klären, ob sich die Überexpression von Lypd6 Auswirkungen auf aggressives Verhalten auswirkt, wurde der *Resident-intruder* Test durchgeführt. Sowohl Wildtyptiere als auch die Tiere der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie zeigten keine gesteigerte Aggressivität nach wiederholter Verletzung des Territoriums. Es konnten weder eine signifikante Senkung der Angriffslatenz oder eine signifikante Erhöhung der Angriffe für beide Genotypen gezeigt werden ($P > 0,05$; Abb. 4.22). Auch konnten keine Unterschiede in der Ausprägung des aggressiven Verhaltens zwischen Wildtyptieren und transgenen Tieren gefunden werden. Zu keinem Messzeitpunkt konnten wir signifikante Unterschiede in der Angriffslatenz oder in der Anzahl der Beißangriffe zwischen Transgenen und Wildtyptieren nachweisen ($P > 0,05$; Abb. 4.22 A/B). Es war lediglich ein Trend zu mehr Angriffen nach 1 Stunde bei den transgenen Tieren feststellbar (Abb. 4.22 B).

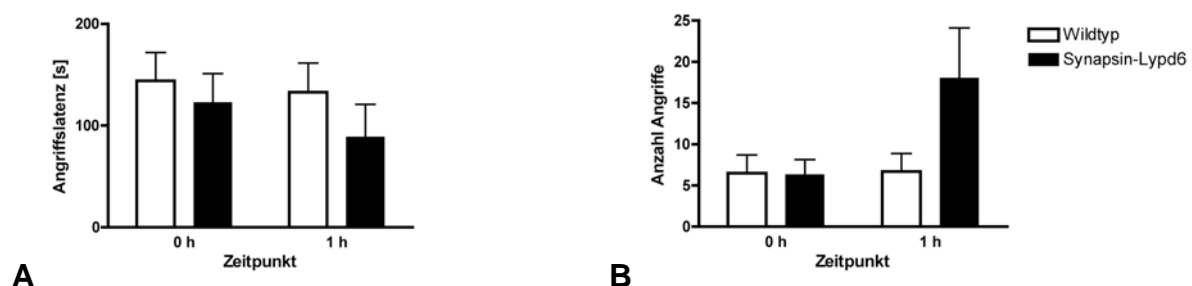


Abb. 4.22 Aggressivität der Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtypiere im *Resident-intruder* Test. (A) Angriffslatenzen und (B) Anzahl der Angriffe von Wildtypieren (weiße Balken) und Transgenen (schwarze Balken) nach der ersten (Zeitpunkt 0 h) und nach einer wiederholten (Zeitpunkt 1 h) Territoriumsverletzung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (jeweils $n = 10$).

4.7.3 Leistung des Arbeitsgedächtnisses

Das Y-Labyrinth wurde eingesetzt um zu ermitteln, ob die transgenen Tiere veränderte Leistungen des Arbeitsgedächtnisses zeigen. Sowohl Wildtyptiere als auch Tiere der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie zeigten im Y-Labyrinth Gedächtnisleistungen, die es ihnen ermöglichten zwischen dem neuen Arm und den unmittelbar vorher besuchten Armen zu unterscheiden. Alle Tiere wechselten vom Gabelpunkt des Labyrinths signifikant häufiger in den neuen als in den vorher besuchten Arm ($P < 0,01$, Abb. 4.23). Unterschiede zwischen den Genotypen in der Ausprägung dieses Verhaltens konnten jedoch nicht gefunden werden. Die Anzahl der Wechsel in einen neuen Arm des Y-Labyrinths war bei den transgenen Tieren zwar signifikant größer als bei den Wildtyptieren ($P < 0,05$; Abb. 4.23 A), jedoch waren die transgenen Tiere insgesamt deutlich aktiver in der Erkundung des Y-Labyrinths als die Wildtyptiere. So war die Gesamtzahl aller Armwechsel bei den transgenen Tieren signifikant größer als bei den Wildtyptieren ($P < 0,05$).

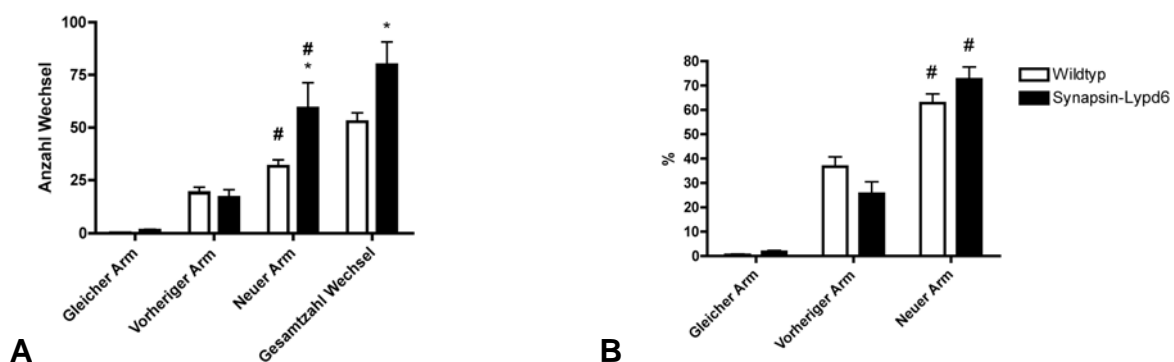


Abb. 4.23 Arbeitsgedächtnisleistung der Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtypiere im Y-Labyrinth. Anzahl der Wechsel vom Gabelpunkt in die Arme des Labyrinths. (A) Absolute Anzahl der Wechsel und (B) Relative Anzahl der Wechsel von Wildtypieren (weiße Balken) und Synapsin-Lypd6 Transgenen (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen ($n = 9$) mit den Wildtyptieren ($n = 10$). # $P < 0,01$ für die Vergleiche der Besuche des neuen Arms mit den Besuchen des vorherigen Arms innerhalb des jeweiligen Genotyps.

Daher wurden die einzelnen Armwechsel für transgene Tiere und Wildtypiere an der jeweiligen Gesamtzahl aller Armwechsel relativiert. Die neuen Werte wurden wie folgt berechnet:

Relative Armwechsel = Absolute Armwechsel / Gesamtzahl der Armwechsel.

Bei den auf diese Art korrigierten Werten konnten keine Unterschiede mehr im Aufsuchen neuer oder bereits aufgesuchter Arme im Y-Labyrinth zwischen Synapsin-Lypd6 Tieren und Wildtypieren festgestellt werden (Abb. 4.23 B, $P > 0,05$).

4.7.4 Angstverhalten

4.7.4.1 Aufsuchen des offenen Bereichs im Offenfeld

Um zu bestimmen, ob sich die Überexpression von Lypd6 auf die Reaktion von Mäusen auf eine angsterregende Situation auswirkt, wurde das Verhalten von Tieren der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie und von Wildtypen im Zentrum des Offenfeldes analysiert. Bei diesem Test fanden wir keine Unterschiede im Angstverhalten zwischen Transgenen und Wildtypen (Abb. 4.24). Zwar suchten Transgene signifikant häufiger das Zentrum der Arena auf als die Wildtypen ($P < 0,01$; Abb. 4.24 A), jedoch ist dies eher eine Folge der gesteigerten Aktivität der Transgenen Tiere. Zudem konnte für die im Zentrum verbrachte Zeit kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Transgenen gemessen werden ($P > 0,05$; Abb. 4.24 B).

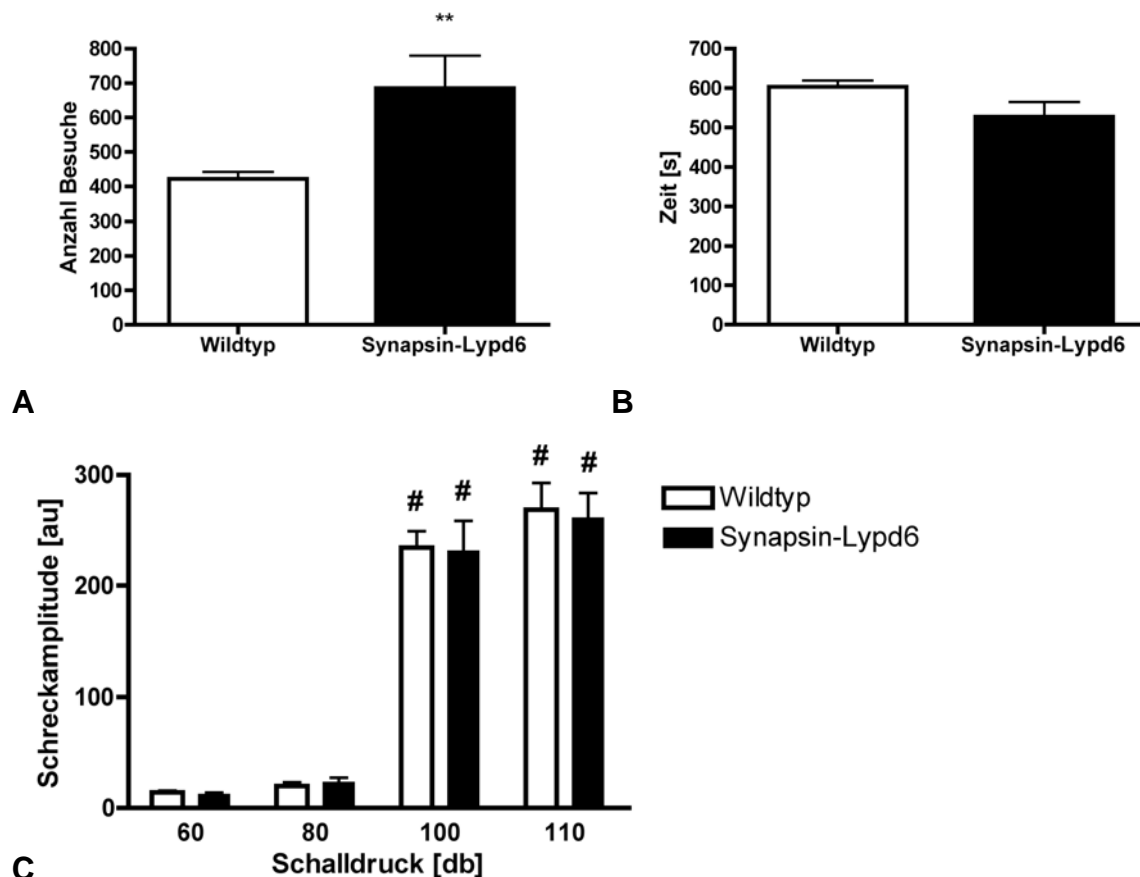


Abb. 4.24 Angstverhalten der Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtypen. (A) Anzahl der Besuche im Zentrum des Offenfeldes, (B) Zeit, die im Zentrum des Offenfeldes verbracht wurde und (C) Schreckamplituden auf akustische Reize. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Wildtypen sind als weiße Balken und Synapsin-Lypd6 Transgene als schwarze Balken dargestellt. ** $P < 0,01$ für Vergleiche zwischen Transgenen und Wildtypen (jeweils $n = 8$). # $P < 0,01$ für innerhalb der Genotypen gezogene Vergleiche der Schreckamplituden auf Schalldrücke von 100 und 110 db mit der jeweiligen Schreckamplitude auf 80 db (jeweils $n = 8$).

4.7.4.2 Startle-Response

Zur Überprüfung, ob es situationsunabhängige Unterschiede im Angstniveau zwischen Tieren der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie und Wildtyptieren gibt, wurde die Schreckreaktion auf akustische Reize gemessen. Zwar zeigten alle analysierten Tiere signifikante Schreckreaktionen auf akustische Reize von 100 und 110 db, doch Unterschiede zwischen den Genotypen konnten nicht bestätigt werden (Abb. 4.24 C). Zweifaktorielle ANOVA der Schreckreaktion zeigte einen deutlich signifikanten Effekt des Schalldrucks ($F_{3,60} = 138,8$, $P < 0,01$), wohingegen kein signifikanter Effekt des Genotyps gefunden werden konnte.

4.7.5 Sensomotorisches Gating

Zur Überprüfung einer Funktion von Lypd6 für sensomotorisches Gating wurde die PPI von Tieren der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie und Wildtyptieren verglichen. In diesem Test konnten wir eine gesteigerte PPI bei den transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren feststellen (Abb. 4.25). Die Schreckreaktion der Transgenen auf einen 110 db Stimulus war signifikant stärker durch einen 80 db Präpuls inhibiert als bei den Wildtyptieren ($P < 0,05$). Die Präpulsinhibition betrug bei Wildtyptieren 59,34 % und bei Transgenen 78,52 %.

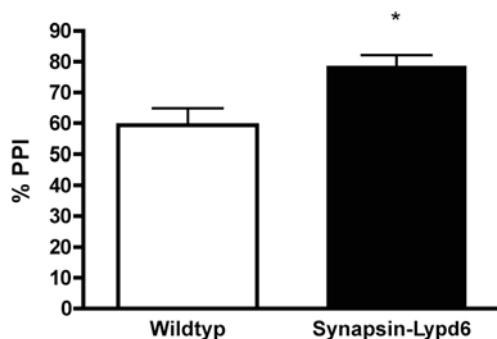


Abb. 4.25 Akustische Präpulsinhibition bei Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtyptieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes der prozentualen Unterdrückung des akustischen Folgeizes (110 db) durch einen Präpuls mit 80 db für Wildtyptiere (weiße Balken) und Transgene (schwarze Balken). * $P < 0,05$ für die paarweisen Vergleiche der Transgenen mit den Wildtyptieren (jeweils $n = 8$).

4.7.6 Schmerzverhalten

4.7.6.1 Spinale Schmerzreaktion auf thermische Reize

Die Auswirkungen der Lypd6-Überexpression auf spinale Schmerzreflexe wurden mit dem *Tail-flick* Test untersucht. Mit diesem Test konnten keine zwischen Tieren der Synapsin-

Lypd6 D17-Mauslinie und Wildtyptieren gefunden werden (Abb. 4.26 A). Transgene zeigten im Vergleich zu den Wildtyptieren keine signifikant unterschiedliche Latenzzeit für das reflexhafte Wegziehen des Schwanzes von der schmerzhaften Hitzequelle ($P < 0,05$).

4.7.6.2 Supraspinale Schmerzreaktion auf thermische Reize

Zur Untersuchung supraspinaler Schmerzverarbeitung bei Tieren der Synapsin-Lypd6D17-Mauslinie wurde der *Hot plate* Test verwendet. Hier konnten keine Unterschiede zwischen Transgenen und Wildtyptieren festgestellt werden (Abb. 4.26 B/C). Weder gab es signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen bei der Latenz bis zum ersten Lecken der Pfoten ($P > 0,05$, Abb. 4.26 B), noch bei der Latenz bis zum ersten Schütteln der Gliedmaßen ($P > 0,05$, Abb. 4.26 C). Keiner der beiden Genotypen zeigte Sprungreaktionen.

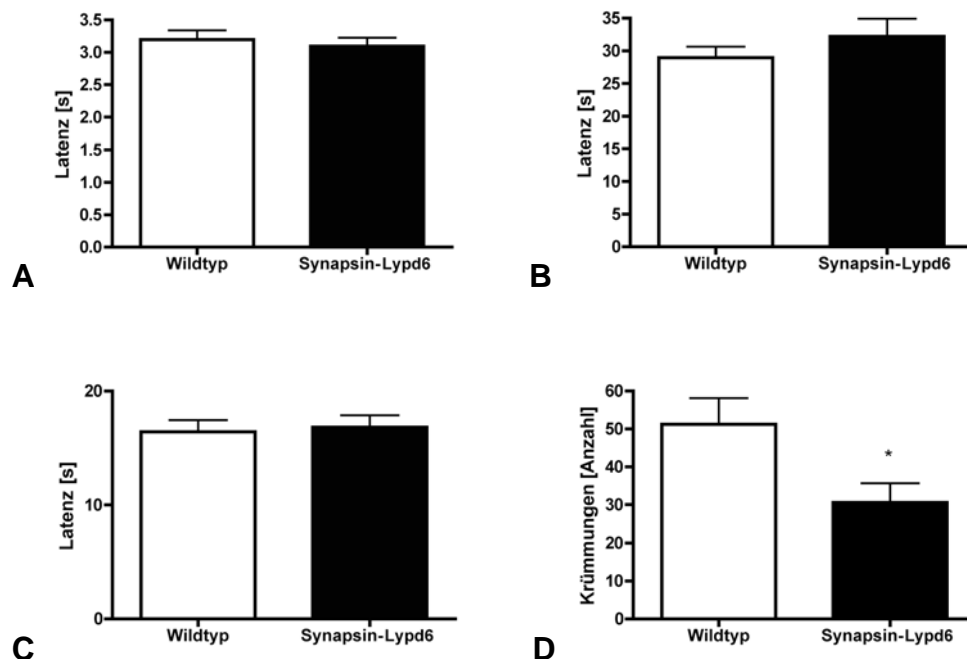


Abb. 4.26 Schmerzverhalten der Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtypiere. (A) Latenzzeiten für den Wegziehreflex ('*Tail-flick*') des Schwanzes von einem schmerzhaften Brennstrahl, (B) Lecken der Pfoten sowie (C) Schütteln der Gliedmaßen auf der Wärmeplatte (52 °C) und (D) Anzahl der Krümmungen innerhalb 30 Minuten nach Injektion von 0,6%iger Essigsäure (i.p.). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Wildtypiere sind als weiße Balken und Transgene als schwarze Balken dargestellt. * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtypieren (jeweils $n = 10$).

4.7.6.3 Schmerzreaktion auf intestinale Reize

Zur Untersuchung der Funktion von Lypd6 bei der Reaktion auf intestinalen Schmerz wurden transgene Tiere der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie und Wildtypiere mit dem *Writhing* Test analysiert. Transgene Tiere reagierten in diesem Test weniger empfindlich auf intestinale

Schmerzreize (Abb. 4.26 D). Nach einer intraperitonealen Injektion von Essigsäure zeigten die Transgenen signifikant weniger Krümmungsreaktionen als die gleichermaßen behandelten Wildtypiere ($P < 0,05$).

4.8 Verhaltenspharmakologische Analyse

4.8.1 Neurotransmittersystem Katecholamine

Wildtypiere und Tiere der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie wurden mit verschiedenen Dosen Ritalin und Amphetamin behandelt, um zu ermitteln, ob es Unterschiede zwischen den Genotypen in der akuten Ritalin- oder Amphetamin-induzierten Hyperlokomotion im Offenfeld gab.

4.8.1.1 Ritalin-induzierte Hyperlokomotion

Beide Gruppen von Mäusen zeigten eine dosisabhängige Steigerung der lokomotorischen Aktivität nach Gabe von Ritalin. Die ANOVA für die isoliert betrachteten Genotypen konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtypiere ($F_{3,28} = 8,38$, $P < 0,01$) und Transgene ($F_{3,28} = 12,41$, $P < 0,01$) belegen. Abgesehen von der erhöhten Basisaktivität bei den Transgenen konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der Reaktion auf die Ritalininjektion gefunden werden (Abb. 4.27 A). Die zweifaktorielle ANOVA der zurückgelegten Distanz nach Injektion von Ritalin zeigte signifikante Effekte von Genotyp ($F_{1,56} = 11,79$, $P < 0,01$) und Dosis ($F_{3,56} = 20,18$, $P < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Messdaten zeigten nur für die Salinebedingung eine signifikant größere lokomotorische Aktivität der transgenen Tiere im

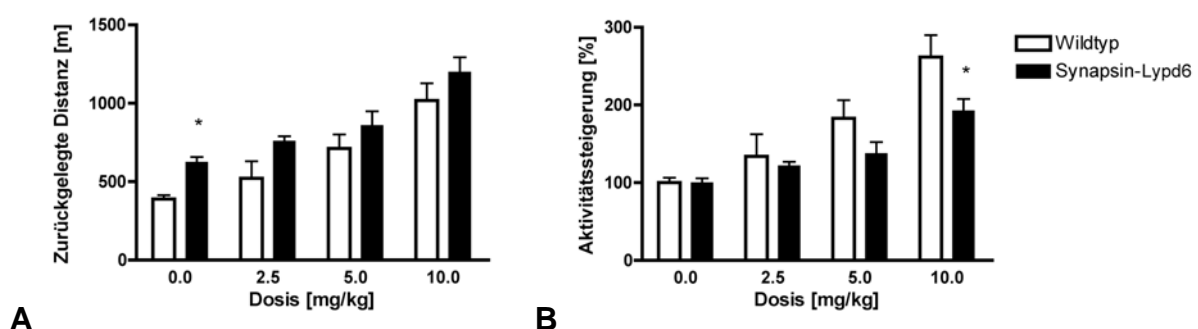


Abb. 4.27 Ritalin-induzierte Hyperlokomotion bei Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtypieren im Offenfeld. Innerhalb einer Stunde nach Injektion von 0, 2,5, 5 und 10 mg/kg Ritalin (i.p.) zurückgelegte Distanz im Offenfeld als (A) Absolute Werte und (B) Prozentuale Steigerung der Nulldosisaktivität von Wildtypieren (weiße Balken) und Transgenen (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes der zurückgelegten Distanz. * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtypieren.

Vergleich zu den Wildtyptieren ($P < 0,05$). Da die transgenen Tiere jedoch gegenüber den Wildtyptieren eine erhöhte Basisaktivität zeigten, wurden neben den absoluten Summenwerten der Aktivität auch Aktivitätssteigerungen als prozentuale Steigerung der Basisaktivitäten berechnet (Abb. 4.27 B). Die zweifaktorielle ANOVA zeigte für die prozentualen Aktivitätssteigerungen signifikante Effekte von Genotyp ($F_{1,56} = 6,02$, $P < 0,05$) und Dosis ($F_{3,56} = 18,33$, $P < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche der prozentualen Aktivitätssteigerungen zeigten nur für die Dosis von 10 mg/kg Ritalin eine signifikant geringere Steigerung der Aktivität der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren ($P < 0,05$). Dies reflektiert jedoch eher den Umstand, dass sich die lokomotorische Aktivität der Versuchstiere aus physikalischen Gründen nicht über einen bestimmten Wert hinaus steigern lässt.

4.8.1.2 Amphetamin-induzierte Hyperlokomotion

Sowohl Transgene als auch Wildtyptiere zeigten eine dosisabhängige Steigerung der lokomotorischen Aktivität nach Gabe von Amphetamin. Die ANOVA für die isoliert betrachteten Genotypen konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtyptiere ($F_{3,28} = 31,86$, $P < 0,01$) und Transgene ($F_{3,28} = 8,53$, $P < 0,01$) bestätigen. Abgesehen von der erhöhten Basisaktivität bei den Transgenen konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der Reaktion auf die Amphetamininjektion gefunden werden (Abb. 4.28 A). Die zweifaktorielle ANOVA der zurückgelegten Distanz nach Injektion von Amphetamin zeigte nur signifikante Effekte der Dosis ($F_{3,56} = 31,40$, $P < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Messdaten zeigten nur für die Salinebedingung eine signifikant größere lokomotorische Aktivität der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren ($P < 0,05$). Da die transgenen Tiere jedoch gegenüber den Wildtyptieren eine erhöhte Basisaktivität zeigten, wurden neben den absoluten Summenwerten auch Aktivitätssteigerungen als prozentuale Steigerung der Basisaktivitäten berechnet (Abb. 4.28 B). Die zweifaktorielle ANOVA zeigte für die prozentualen Aktivitätssteigerungen signifikante Effekte von Genotyp ($F_{1,56} = 12,90$, $P < 0,01$), Dosis ($F_{3,56} = 34,59$, $P < 0,01$) und die Interaktion von Genotyp und Dosis ($F_{3,51} = 2,79$, $P < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche der prozentualen Aktivitätssteigerungen zeigten für die Dosen von 1,25 und 2,5 mg/kg Amphetamin eine signifikant geringere Steigerung der Aktivität der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren ($P < 0,01$). Auch hier ist die Erklärung eher in physikalischen Beschränkungen der Aktivität als in unterschiedlichen Dosiswirkungen zu suchen.

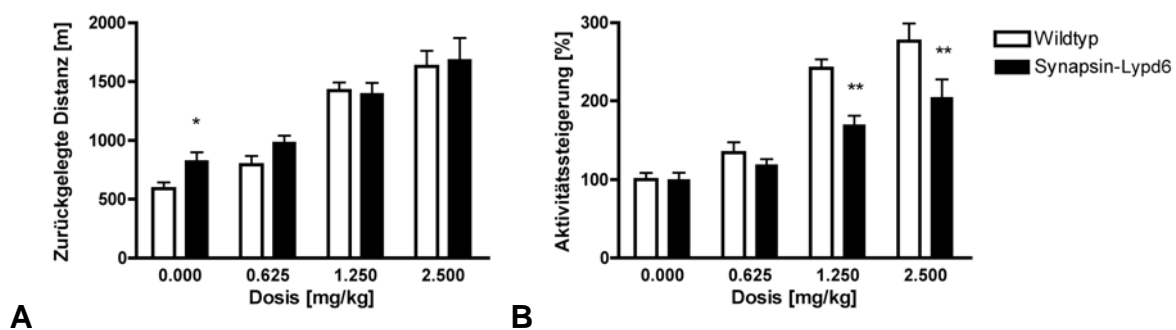


Abb. 4.28 Amphetamin-induzierte Hyperlokomotion bei Synapsin-Lydp6 Transgenen und Wildtyptieren im Offenfeld. Innerhalb von 90 Minuten nach Injektion von 0, 0,625, 1,25 und 2,5 mg/kg Amphetamin (i.p.) zurückgelegte Distanz im Offenfeld als (A) Absolute Werte und (B) Prozentuale Steigerung der Null dosisaktivität von Wildtyptieren (weiße Balken) und Transgenen (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes der zurückgelegten Distanz. * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtyptieren.

4.8.2 Neurotransmittersystem Glutamat: Phencyclidin-induzierte Hyperlokomotion

Wildtypiere und Tiere der Synapsin-Lydp6 D17-Mauslinie wurden mit verschiedenen Dosen Phencyclidin behandelt, um zu ermitteln, ob es Unterschiede zwischen den Genotypen in der akuten Phencyclidin-induzierten Hyperlokomotion im Offenfeld gab. Sowohl Transgene als auch Wildtypiere zeigten eine dosisabhängige Steigerung der lokomotorischen Aktivität nach Gabe von Phencyclidin. Die ANOVA für die isoliert betrachteten Genotypen konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtypiere ($F_{4,35} = 27,11$, $P < 0,01$) und Transgene ($F_{4,35} = 8,53$, $P < 0,01$) beweisen. Außer der erhöhten Basisaktivität bei den Transgenen konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der Reaktion auf die Phencyclidininjektion gefunden werden (Abb. 4.29 A). Die zweifaktorielle ANOVA der zurückgelegten Distanz nach Injektion von Phencyclidin zeigte signifikante Effekte von Dosis ($F_{4,70} = 29,93$, $P < 0,01$) und Genotyp ($F_{1,70} = 5,45$, $P < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Messdaten belegten nur für die Salinebedingung eine signifikant größere lokomotorische Aktivität der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtypieren ($P < 0,05$). Da die transgenen Tiere jedoch gegenüber den Wildtypieren eine erhöhte Basisaktivität zeigten, wurden neben den absoluten Summenwerten auch Aktivitätssteigerungen als prozentuale Steigerung der Basisaktivitäten berechnet (Abb. 4.29 B). Die zweifaktorielle ANOVA zeigte für die prozentualen Aktivitätssteigerungen signifikante Effekte von Genotyp ($F_{1,70} = 13,76$, $P < 0,01$), Dosis ($F_{4,70} = 31,70$, $P < 0,01$) und die Interaktion von Genotyp und Dosis ($F_{4,70} = 3,48$, $P < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche der prozentualen Aktivitätssteigerungen zeigten für die Dosen von 5 und 10 mg/kg Phencyclidin eine signifikant geringere Steigerung der Aktivität der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtypieren ($P < 0,01$). Die Begründung ist auch in diesem Fall in Phencyclidin-unabhängigen physikalischen Barrieren der lokomotorischen Aktivität zu suchen.

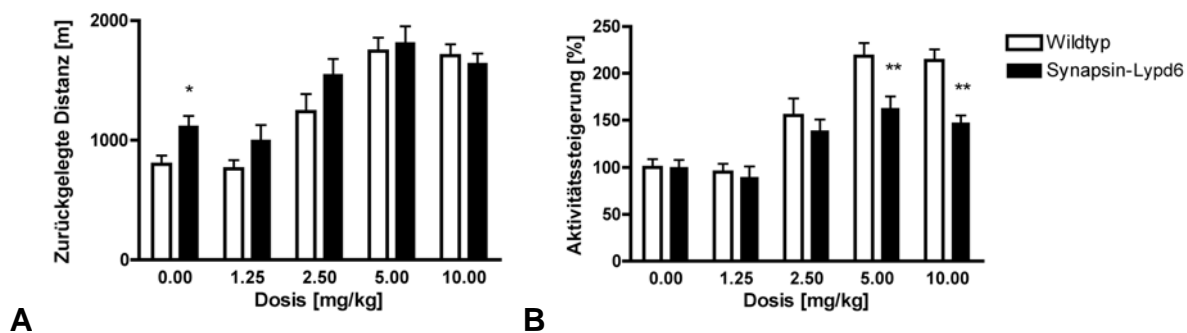


Abb. 4.29 Phencyclidin-induzierte Hyperlokomotion bei Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtypen im Offenfeld. Innerhalb von 2 Stunden nach Injektion von 0, 1,25, 2,5, 5 und 10 mg/kg Phencyclidin (s.c.) zurückgelegte Distanz im Offenfeld als (A) Absolute Werte und (B) Prozentuale Steigerung der Null dosisaktivität von Wildtypen (weiße Balken) und Transgenen (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes der zurückgelegten Distanz. * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtypen.

4.8.3 Neurotransmittersystem Acetylcholin

Wildtypen und Tiere der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie wurden mit verschiedenen Dosen Nikotin behandelt, um zu ermitteln, ob es Unterschiede zwischen den Genotypen in den akuten Effekten von Nikotin auf Lokomotion und Schmerzverhalten gab.

4.8.3.1 Nikotin-induzierte Hypolokomotion

Bei Transgenen und Wildtypen konnten wir eine dosisabhängige Senkung der lokomotorischen Aktivität im Offenfeld nach Nikotiningabe finden. Die ANOVA für die isoliert betrachteten Genotypen konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtypen ($F_{5,42} = 16,32$, $P < 0,01$) und Transgene ($F_{5,42} = 14,16$, $P < 0,01$) belegen. Auch in diesem Experiment konnten wir jedoch lediglich in der Salinegruppe Unterschiede in der Aktivität zwischen den Genotypen feststellen (Abb. 4.30). Zunächst konnten wir zwar mit einer zweifaktoriellen ANOVA signifikante Effekte von Dosis ($F_{5,84} = 29,36$, $P < 0,01$) und Genotyp ($F_{1,84} = 47,83$, $P < 0,01$) zeigen. Und auch *Post-hoc* Vergleiche dieser Messdaten zeigten signifikant höhere lokomotorische Aktivitäten der transgenen Tiere in der Salinegruppe sowie für die Dosen vor 0,25, 0,3 und 0,5 mg/kg Nikotin ($P < 0,05$; Abb. 4.30 A). Da die transgenen Tiere jedoch gegenüber den Wildtypen eine erhöhte Basisaktivität zeigten wurden neben den absoluten Summenwerten auch Aktivitätssenkungen als prozentuale Senkung der Basisaktivitäten berechnet (Abb. 4.30 B). Die zweifaktorielle ANOVA zeigte für die prozentualen Aktivitätssenkungen signifikante Effekte der Dosis ($F_{5,84} = 30,47$, $P < 0,01$).

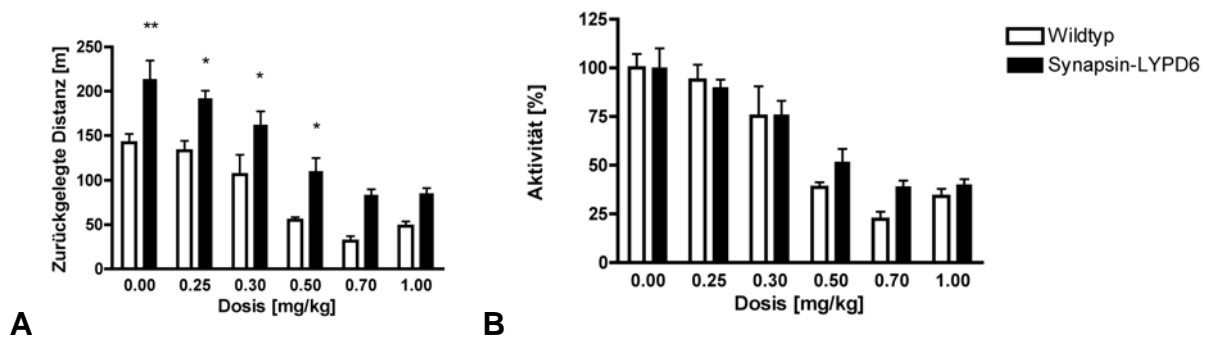


Abb. 4.30 Nikotin-induzierte Hypolokomotion bei Synapsin-LYPD6 Transgenen und Wildtyptieren im Offenfeld. Innerhalb von 10 Minuten nach Injektion von 0, 0,25, 0,3, 0,5, 0,7 und 1 mg/kg Nikotin (s.c.) zurückgelegte Distanz im Offenfeld als (A) Absolute Werte und (B) Prozentuale Senkung der Nulldosisaktivität von Wildtyptieren (weiße Balken) und Transgenen (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes der zurückgelegten Distanz. * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtyptieren.

Post-hoc Vergleiche der prozentualen Aktivitätssenkungen der Genotypen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$).

4.8.3.2 Nikotin-induzierte Analgesie im *Tail-flick* Test

Nikotin erhöhte in dosisabhängiger Weise die Latenz des Schmerzreflexes bei Wildtyptieren und Transgenen im *Tail-flick* Test (Abb. 4.31). Die Latenzzeiten wurden umgerechnet als Prozentanteile des maximal erreichbaren Effektes. Die Umrechnung erfolgte mit folgender Gleichung:

$$\text{MPE \%} = 100 \times (\text{Gemessene Latenz} - \text{Kontrolllatenz}) / (\text{Cutoff Zeit} - \text{Kontrolllatenz}).$$

Die ANOVA für die isoliert betrachteten Genotypen konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtyptiere ($F_{7,56} = 10,40$, $P < 0,01$) und Transgene ($F_{7,56} = 11,97$, $P < 0,01$) belegen. Es konnte zudem ein signifikanter Unterschied in der analgetischen Wirkung von Nikotin zwischen den Gruppen gefunden werden. Die zweifaktorielle ANOVA zeigte signifikante

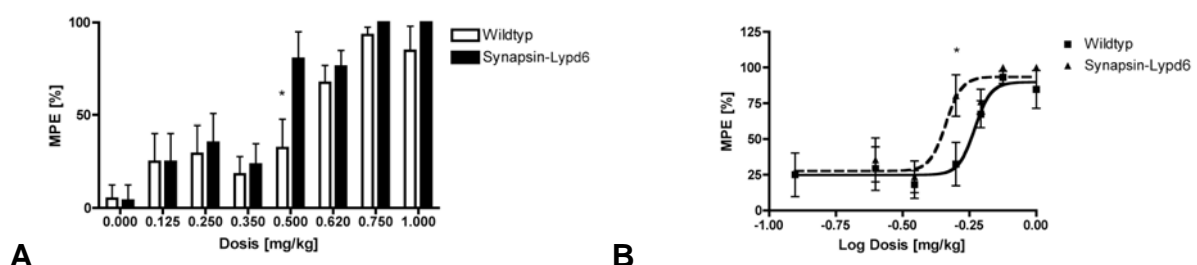


Abb. 4.31 Nikotin-induzierte Analgesie bei Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtyptieren im *Tail-flick* Test. Antinozizeptive Effekte akuter Injektionen von 0, 0,125, 0,25, 0,3, 0,5, 0,62, 0,75 und 1 mg/kg Nikotin (s.c.) bei Wildtyptieren (weiße Balken, durchgezogene Linie) und Transgenen (schwarze Balken, gestrichelte Linie). Dosiswirkung nach 5 Minuten als (A) Balkendiagramm und (B) Logarithmische Darstellung der Dosen und sigmoide Kurvenanpassung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Latenz. * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtyptieren.

Effekte von Dosis ($F_{7,112} = 18,14$, $P < 0,01$) und Genotyp ($F_{1,112} = 5,66$, $P < 0,05$) auf den MPE %. *Post-hoc* Vergleiche zwischen den Genotypen zeigten eine signifikant größere MPE % bei den transgenen Tiere für die Dosis von 0,5 mg/kg Nikotin ($P < 0,5$). Anhand der sigmoiden Kurvenanpassung der logarithmierten Dosiswirkungskurve (Abb. 4.31 B) konnte eine ED50 (Dosis, die 50% des maximalen Effekts bewirkt) für Wildtyptiere und Transgene berechnet werden. Die ED50 für die Wildtyptiere (0,5887 mg/kg) war signifikant höher ($P < 0,05$) als die ED50 der Synapsin-Lypd6 transgenen Tiere (0,4587 mg/kg).

4.8.3.3 Nikotin-induzierte Analgesie im *Hot plate* Test

Nikotin erhöhte die Latenz von Schmerzreaktionen auf der *Hot plate* bei Wildtyptieren und Transgenen nur bei einer Dosis von 1 mg/kg (Abb. 4.32). Die Latenzzeiten wurden umgerechnet als Prozentanteile des maximal erreichbaren Effektes. Die Umrechnung erfolgte mit folgender Gleichung:

$$\text{MPE \%} = 100 \times (\text{Gemessene Latenz} - \text{Kontrolllatenz}) / (\text{Cutoff Zeit} - \text{Kontrolllatenz}).$$

Die ANOVA der Leckreaktionen konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtyptiere ($F_{2,21} = 5,21$, $P < 0,05$) und Transgene ($F_{2,21} = 10,92$, $P < 0,01$) nachweisen. Die ANOVA der Schüttelreaktion konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtyptiere ($F_{2,21} = 13,39$, $P < 0,01$) und keine signifikanten Effekte für Transgene ($F_{2,21} = 2,12$, $P > 0,05$) belegen. Unterschiede zwischen den Genotypen konnten nicht nachgewiesen werden. Die zweifaktorielle ANOVA zeigte lediglich signifikante Effekte der Dosis für die Leckreaktion ($F_{2,42} = 15,26$, $P < 0,01$) und die Schüttelreaktion ($F_{2,42} = 10,67$, $P < 0,01$).

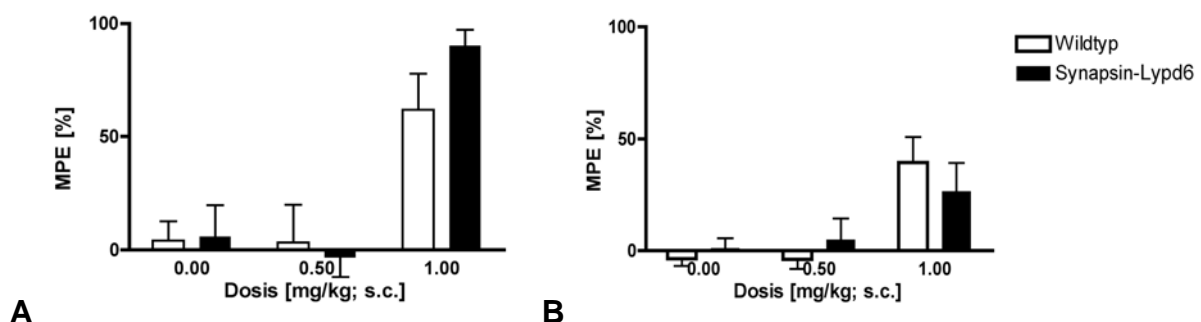


Abb. 4.32 Nikotin-induzierte Analgesie bei Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtyptieren auf der *Hot plate*. Antinozizeptive Effekte akuter Injektionen von 0, 0,5 und 1 mg/kg Nikotin (s.c.) bei Wildtyptieren (weiße Balken) und Transgenen (schwarze Balken). (A) Leckreaktion und (B) Schüttelreaktion 5 Minuten nach der Injektion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes der Latenzen.

4.8.3.4 Nikotin-induzierte Analgesie im *Writhing* Paradigma

Bei Transgenen und Wildtyptieren konnten wir eine dosisabhängige Senkung der Anzahl von Schmerzreaktionen auf die Injektion von Essigsäure belegen (Abb. 4.33). Die ANOVA für die

isoliert betrachteten Genotypen konnte signifikante Effekte der Dosis für Wildtyptiere ($F_{3,72} = 5,21$, $P < 0,01$) und Transgene ($F_{3,72} = 10,92$, $P < 0,01$) bestätigen. Zusätzlich fanden wir signifikante Unterschiede in der analgetischen Wirkung von Nikotin zwischen den Genotypen. Die zweifaktorielle ANOVA der Krümmungsreaktionen zeigte signifikante Effekte der Dosis ($F_{3,72} = 39,14$, $P < 0,01$) und des Genotyps ($F_{1,72} = 11,76$, $P < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche zeigten signifikant weniger Krümmungsreaktionen für die transgenen Tiere bei 0, 0,25 und 0,5 mg/kg Nikotin ($P < 0,05$). Jedoch war bei den Wildtyptieren eine dosisabhängige Steigerung des Nikotineffektes zu verzeichnen, wohingegen bei den Transgenen schon bei einer Dosis von 0,25 mg/kg Nikotin der maximal mögliche Effekt eintrat und eine Erhöhung der Nikotindosis keine weitere Steigerung des Effektes bewirkte.

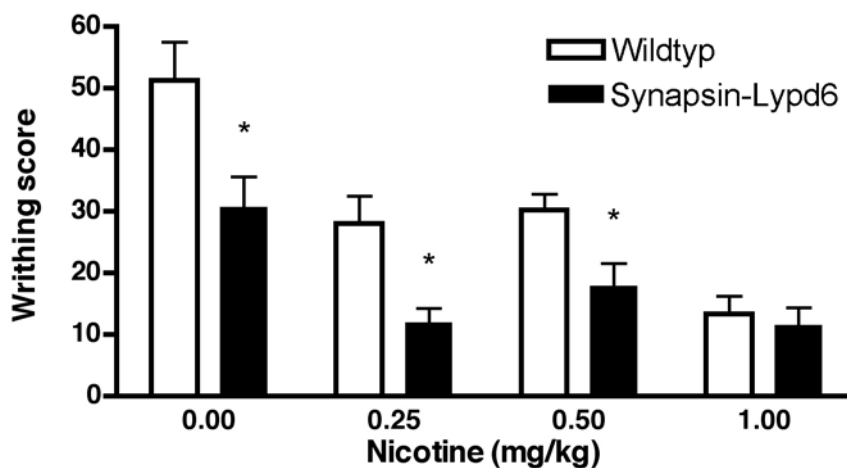


Abb. 4.33 Nikotin-induzierte Analgesie bei Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtyptieren im Writhing Test. Antinozizeptive Effekte akuter Injektionen von 0, 0,25, 0,5 und 1 mg/kg Nikotin (i.p.) bei Wildtyptieren (weiße Balken) und Transgenen (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwertes der Anzahl der Krümmungen nach i.p. Injektion von 0,6%iger Essigsäure in einem Zeitraum von 30 Minuten nach der Injektion. * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtyptieren.

4.9 Elektrophysiologie

Um für die in den pharmakologischen Untersuchungen entdeckten Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Nikotin ein neurophysiologisches Korrelat zu finden, wurden Nikotin-induzierte Ströme durch nAChR-Kanäle in Wildtyptieren und Tieren der Synapsin-Lypd6 D17-Mauslinie gemessen. Nikotin-induzierte Ströme konnten in Wildtyptieren und transgenen Tieren ab Konzentrationen von 500 μ M Nikotin ausgelöst werden, jedoch konnten wir keine Unterschiede bei den Nikotin-induzierten Gesamtströme von Wildtyptieren und Transgenen finden (Abb. 4.34). Die Unterschiede zwischen Wildtyptieren ($n = 5$) und transgenen Tieren ($n = 13$) in den Peakamplituden der Gesamtströme nach Applikation von 1 mM Nikotin waren nicht signifikant ($P > 0,05$).

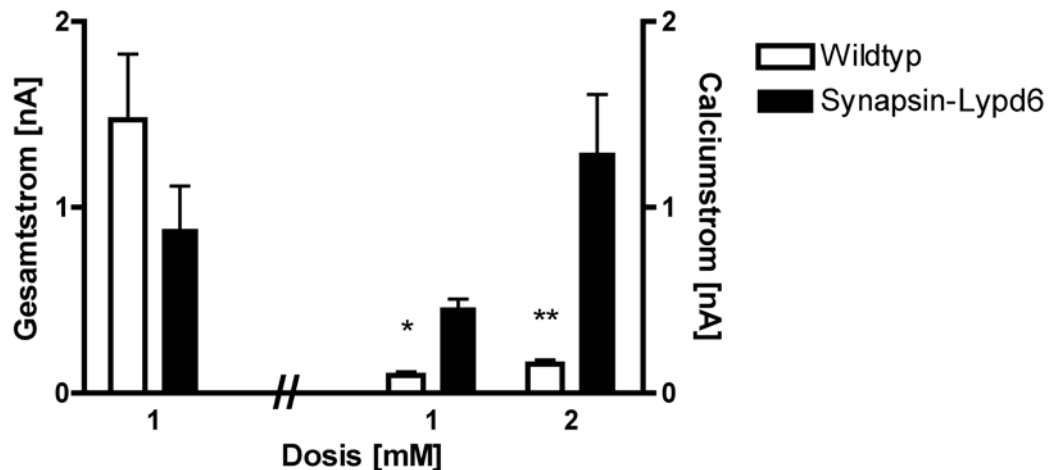


Abb. 4.34 Nikotin-induzierte Ströme trigeminaler Neurone von Synapsin-Lypd6 Transgenen und Wildtyptieren. Gesamtströme nach Applikation von 1 mM Nikotin (linke Hälfte der Abbildung) und isolierte Calcium-Stromkomponenten nach Applikation von 1 mM und 2 mM Nikotin trigeminaler Neurone von Wildtyptieren und Synapsin-LYPD6 transgenen Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwertes der Peakamplituden. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ für die Vergleiche der Transgenen mit den Wildtyptieren.

Auch die Peakamplituden der isolierten Natrium- bzw. Kalium-Stromkomponenten des Gesamtstroms zeigten keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu fanden wir bei den Transgenen eine deutlich gesteigert Calciumkomponente der Nikotin-induzierten Ströme. Die zweifaktorielle ANOVA der Peakamplituden der Calcium-Stromkomponenten der Gesamtströme (getestet mit 1 mM und 2 mM Nikotin; Abb. 4.34) im Wildtyp (1 mM $n = 11$, 2 mM $n = 9$) versus Transgen (1 mM $n = 8$, 2 mM $n = 5$) zeigte signifikante Effekte von Genotyp ($F_{1,29} = 55,62$; $P < 0,01$), Dosis ($F_{1,29} = 19,87$; $P < 0,01$) und der Interaktion von Genotyp und Dosis ($F_{1,29} = 14,80$; $P < 0,01$). Diese Interaktion ist ordinaler Natur, das heißt, dass die Effekte sowohl für die Wildtyptiere als auch für die transgenen Tiere den gleichen Trend aufweisen, dieser jedoch für die transgenen Tiere einen steileren Verlauf hat. Dementsprechend ist es zulässig die Effekte von Genotyp und Dosis zu interpretieren. *Post-hoc* Vergleiche zeigten signifikant größere Ca-Stromkomponenten bei den transgenen Neuronen für Nikotindosen von 1 und 2 mM ($P < 0,01$).

Durch Koapplikation von Mecamylamin (10 μM) mit Nikotin (1 mM) wurde sowohl bei transgenen Mäusen als auch bei Wildtyp-Mäusen die Peakamplitude um ca. 60% (Mecamylamin 10 μM ; $n = 9$) reduziert ($P < 0,05$; Abb. 4.35).

Die Koapplikation von alpha-Bungarotoxin (10 nM) mit Nikotin hatte keinen Effekt auf die induzierten Ströme.

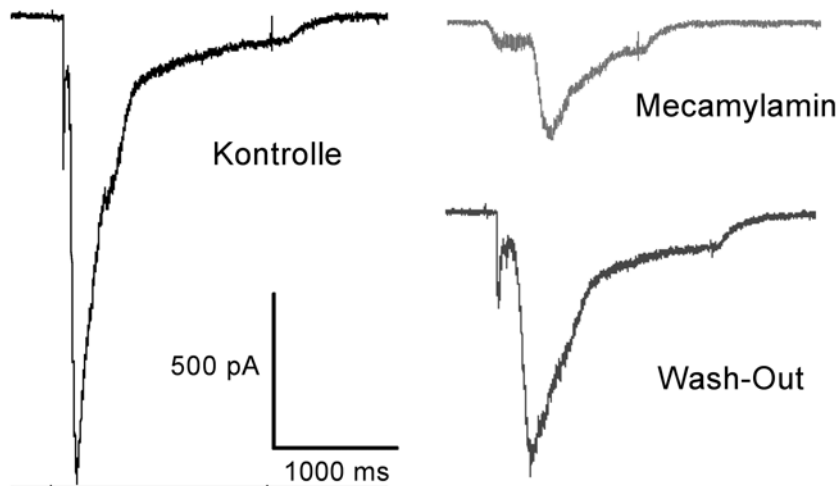


Abb. 4.35 Blockade der Nikotin-induzierten Ströme trigeminaler Neurone durch Mecamylamin. Nikotin-induzierte Gesamtstromantworten einer trigeminalen Nervenzelle (Symapsin-Lypd6 transgen) vor der Applikation von Mecamylamin (Kontrolle), nach der Gabe von Mecamylamin (Mecamylamin) und nach dem Auswaschen von Mecamylamin (*Wash-Out*).

4.10 siRNA vermittelte Reduktion des Lypd6-Transkriptes

4.10.1 *In vitro*-Validierung verschiedener siRNAs gegen Lypd6

Für die *in vitro*-Validierung von siRNAs gegen Lypd6 wurde zunächst ein Lypd6-EGFP Expressions-Vektor kloniert. Die EGFP-Aminosäuresequenz wurde an den C-Terminus des Lypd6-Proteins fusioniert. In Abbildung 4.36 ist das Reporterkonstrukt schematisch dargestellt. Mit diesem Reporterkonstrukt wurde durch stabile Transfektion mit Selektion auf G418 die Zelllinie CHO Lypd6 EGFP hergestellt. In dieser Zelllinie konnte das fluoreszierende Fusionsprotein im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Abb. 4.37 A).

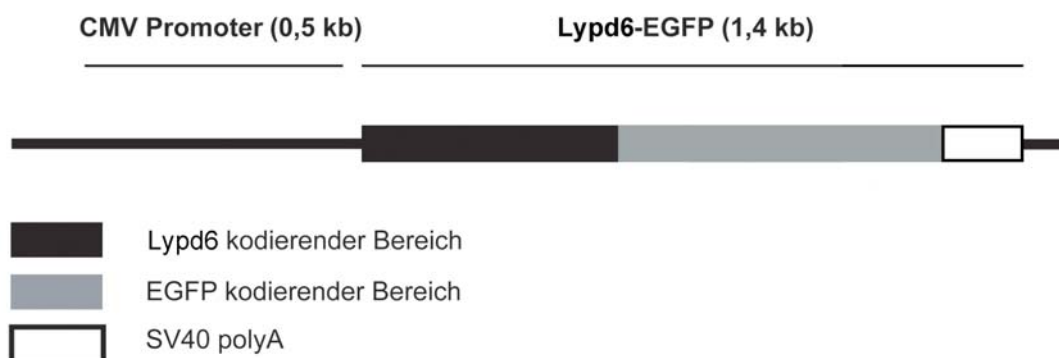


Abb. 4.36 Grafische Darstellung des EGFP-Lypd6 Reporterkonstrukts. Der Promotor ist als schwarze Linie und das Fusionsprotein als schwarz-grauer Balken dargestellt.

Diese Zellen wurden mit 4 verschiedenen siRNAs gegen Lypd6 und siRNA gegen *Firefly* Luciferase (Kontrolle) transfiziert und 48 Stunden später die Lypd6-Expression gemessen. Mittels *Real time* PCR konnte für zwei siRNAs eine starke Reduktion der Lypd6-Expression gemessen werden (Abb. 4.37 B). Die ANOVA der Expressionsdaten ergab einen signifikanten Effekt der Transfektion mit siRNA ($F_{4,20} = 442,8$, $P < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche zeigten eine bedeutsame Reduktion der Expression in den mit siRNA 97792 (90 %) und Stealth 770 (90,1 %) transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit siRNA gegen *Firefly* Luciferase transfizierten Zellen (je $P < 0,01$). Durch quantitative Analyse der Fluoreszenz der transfizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie am FACS konnte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz in den mit siRNA 97792 (74 %) und Stealth 770 (77 %) transfizierten Zellen gezeigt werden (Abb. 4.37 C). Die ANOVA der Fluoreszenzdaten ergab einen signifikanten Effekt der Transfektion mit siRNA ($F_{2,14} = 615,4$, $P < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche bestätigten die Reduktion der Fluoreszenz in den mit siRNA 97792 und Stealth 770 transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit siRNA gegen *Firefly* Luciferase transfizierten Zellen (je $P < 0,01$).

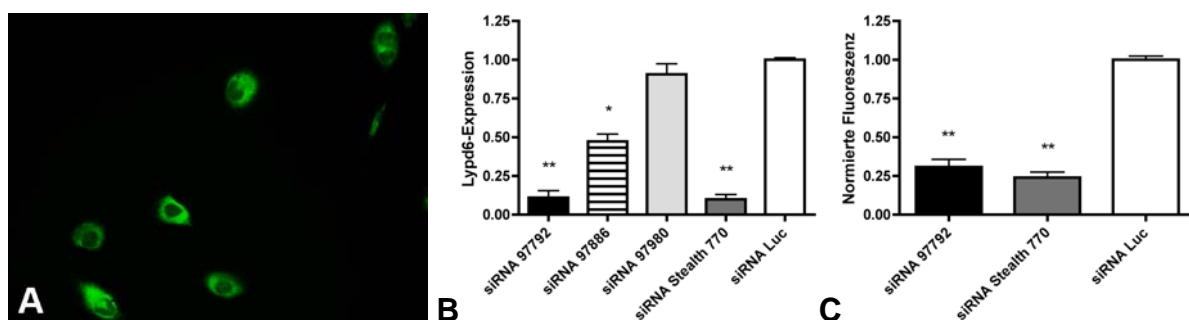


Abb. 4.37 RNA-Interferenz verschiedener siRNAs in EGFP-Lypd6 exprimierenden CHO-K1 Zellen. (A) Expression des EGFP-Lypd6 Fusionsproteins in der EGFP-Lypd6 CHO-K1 Zelllinie. Analyse der RNA-Interferenz auf RNA- (B) und Proteinebene (C). Alle Messungen wurden 48 Stunden nach Transfektion der EGFP-Lypd6 CHO-K1 Zelllinie mit siRNA gegen Lypd6 (siRNA 97792, siRNA 97886, siRNA 97980 und siRNA Stealth 770) und siRNA gegen *Firefly* Luciferase (siRNA Luc) durchgeführt. (B) Quantitative Analyse der Gesamt-RNA in der EGFP-Lypd6 CHO-K1 Zelllinie durch Real time PCR mit spezifischen Primern für Lypd6 und TBP. (C) Quantitative Analyse der Fluoreszenz in der EGFP-Lypd6 CHO-K1 Zelllinie durch FACS-Analyse. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Die jeweiligen Werte wurden auf die Expression in der Kontrollgruppe (Transfektion mit siRNA gegen *Firefly* Luciferase) normalisiert. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ für Vergleiche mit der Transfektion mit siRNA Luc.

4.11 siRNA-transgene Mauslinien

Für die Erzeugung transgener Mauslinien mit reduzierter Lypd6-Expression wurde ein siRNA-Vektor (pLL3.7 Lypd6) kloniert, der neben einer Lypd6-shRNA ('*small hairpin* RNA') auch ein gefloxtes EGFP-Reportergen enthielt. Für die ubiquitäre Expression der shRNA

wurde ein U6-Promotor verwendet. In Abbildung 4.38 ist das Expressionsreduktionskonstrukt in linearisierter Form schematisch dargestellt.

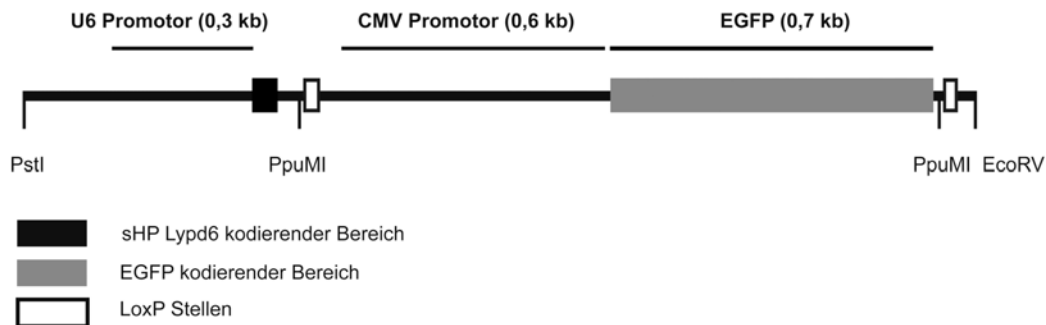


Abb. 4.38 Grafische Darstellung des Lypd6 Expressionsreduktionskonstrukts pLL3.7 Lypd6. Die Promotoren sind als schwarze Linien, der kodierende Bereich für die siRNA-Haarnadel (sHP) als schwarzer Balken, die LoxP Stellen als weiße Balken und das Reportergen als grauer Balken dargestellt. Eingetragen sind Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen *PstI*, *PpuMI* und *EcoRV*.

4.11.1 Validierung des Expressionreduktionskonstrukts in Zellkultur

Vor der Erzeugung transgener Tiere wurde das Expressionsreduktionskonstrukt zunächst in Zellkulturexperimenten auf seine Effizienz hin überprüft. Die transiente Transfektion von Neuro-2a Zellen mit dem siRNA-Vektor führte 48 Stunden nach der Transfektion zu einer deutlichen Reduktion (ca. 70 %) der Lypd6-mRNA (Abb. 4.39). Die ANOVA der Expressionsdaten ergab einen signifikanten Effekt der Transfektion ($F_{3,19} = 4,81$, $P < 0,05$).

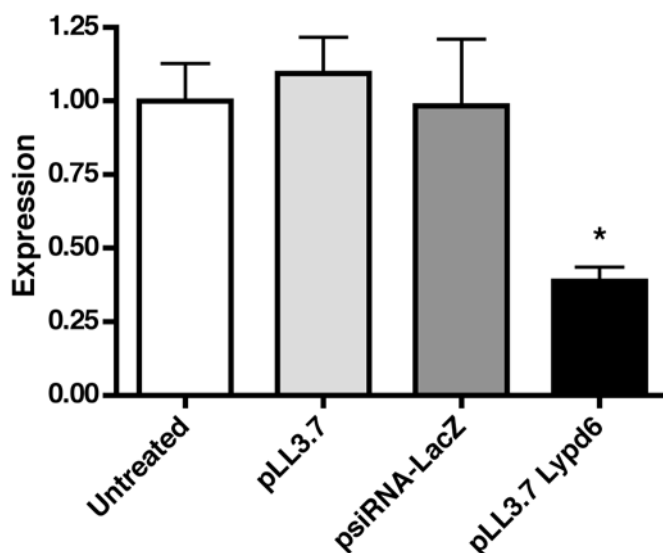


Abb. 4.39 pLL3.7 Lypd6 vermittelte RNA-Interferenz in Neuro-2a Zellen. Quantitative Analyse der Gesamt-RNA in Neuro-2A Zellen durch Real time PCR mit spezifischen Primern für Lypd6 und TBP. Die Expression ist dargestellt als Vielfaches der Expression in untransfizierten Neuro-2A Zellen. * $P < 0,05$.

Post-hoc Vergleiche bestätigten die Reduktion der Expression in den mit pLL3.7 Lypd6 transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten und mit pLL3.7 oder psiRNA LacZ transfizierten Zellen ($P < 0,05$).

4.11.2 Herstellung von transgenen Mäusen mit Lypd6-Expressionsreduktion

Der siRNA-Vektor wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und das Restriktionsfragment aus dem Gel isoliert. Das so isolierte Fragment wurde gefällt und in sterilem TE-Puffer aufgenommen. Dieses Fragment enthielt lediglich den Promotor, die shRNA-Sequenz und das gefloxt Reportergen. Aus der Injektion in die Vorkerne befruchteter Eizellen und dem Retransfer dieser Oozyten in pseudoschwangere Ammenmütter resultierten 71 putativ transgene Mäuse. Die Genotypisierung dieser Mäuse ergab, dass drei Männchen und drei Weibchen transgen waren. Nur in transgenen Tieren konnte mit der GFP-DIG-Sonde ein 1300 Basenpaare langes Fragment nachgewiesen werden. Abbildung 4.40 zeigt beispielhaft eine *Southern-Blot* Genotypisierungsanalyse.

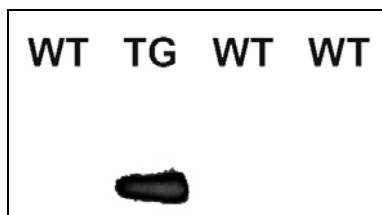


Abb. 4.40 Genotypisierung der transgenen Mäuse. *Southern-Blot* Analyse der genomischen DNA von Wildtyp- (WT) und transgenen (TG) Mäusen. Alle DNA-Proben wurden mit *PpuMI* verdaut. Die Bande des integrierten Expressionsreduktionskonstrukt läuft bei 1300 bp.

4.11.3 Reduktion der Lypd6-Expression in den sHP-Lypd6 Mauslinien

Mit den 6 hergestellten sHP-Lypd6 transgenen Tieren konnte keine Zucht etabliert werden. Ein transgenes Männchen musste im Alter von 8 Wochen getötet werden, da sich bei ihm eine Entzündung im Urogenitalbereich mit fatalem Ausgang entwickelt hatte. Das Männchen wurde zwar für eine Verpaarung eingesetzt, konnte sich aber nicht fortpflanzen. Das zweite transgene Männchen konnte sich zwar fortpflanzen, jedoch war von 82 gezeugten Nachkommen (44 Männchen und 38 Weibchen) nur 1 Männchen transgen. Dieses transgene Männchen hat sich jedoch bis dato nicht fortpflanzen können. Das dritte erzeugte transgene Männchen konnte sich zwar fortpflanzen, jedoch zeugte es bislang lediglich 3 Nachkommen (3 Weibchen), bei denen das Transgen nicht nachgewiesen werden konnte. Die transgenen Weibchen erzeugten ebenfalls nur kleine Würfe mit Nachkommen, bei denen

das Transgen nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Übersicht über die Verpaarungen ist Tabelle 4.5 zu entnehmen.

Tab. 4.5 Zucht der transgenen Knockdown-Founder. Anzahl und Genotyp der Nachkommen von drei transgenen Männchen (m26, m21 und m65) und drei transgenen Weibchen (w54, w70 und w82).

	m26	m21	m65	w54	w70	w82	Total
Wildtyp	0	80	3	9	8	3	103
Transgen	0	2	0	0	0	0	2
Total	0	82	3	9	8	3	105

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung des Lypd6-Proteins

Aufgrund der Konservierung des Cystein-reichen Konsensusmotivs der Ly6-UPAR-Domäne wurde Lypd6 als neues Mitglied der Ly6-UPAR-Superfamilie klassifiziert (Behrendt et al., 1991). Die Ly6-UPAR-Domäne liegt fast immer einzeln vor, obwohl einzelne Proteine der Ly6-UPAR-Superfamilie, wie zum Beispiel RoBol (Noel et al., 1998), CD177 (Stroncek et al., 2004) oder Plaur (Solberg et al., 1992; Wilhelm et al., 1999) über zwei, bzw. drei dieser Domänen verfügen. Das Vorhandensein von wiederholten UPAR-Domänen legt den Schluss nahe, dass RoBol, CD177 und Plaur aus internen Duplikationen oder Triplikationen einer ancestralen Domäne entstanden sind. Zu dieser Superfamilie werden bislang 359 eukaryotische Proteine gezählt.

Die Ly6-UPAR-Proteine sind meist Glykosyl-Phosphatidyloisitol (GPI) verankerte Zelloberflächenproteine (Mallya et al., 2006). Es gibt aber neben den GPI-verankerten Ly6-UPAR-Proteinen auch sezernierte Mitglieder dieser Proteinfamilie, die über keinen GPI-Anker verfügen wie zum Beispiel die Schlangen-Neurotoxine (Fleming et al., 1993), Slurp1 (Adermann et al., 1999) oder Slurp2 (Tsuji et al., 2003). Auch für Lypd6 gibt es deutliche Hinweise für dessen Sekretion. So konnten Zhang und Henzel für das humane Lypd6-Protein die Abspaltung des sekretorischen Signalpeptids in Zellkulturexperimenten nachweisen (Zhang and Henzel, 2004). Dies ist konsistent mit der in dieser Arbeit gefundenen perinukleären Lokalisierung des Lypd6-HA Fusionsproteins, da sezernierte Proteine über das endoplasmatische Retikulum in sekretorische Signalwege eingehen.

Unter den Ly6-UPAR-Proteinen befinden sich auch die zu Lypd6 am stärksten homologen Proteine Lynx1 (Miwa et al., 1999), Plaur (Behrendt et al., 1991), Ly6-A (Bamezai and Rock, 1995), Slurp1 (Adermann et al., 1999) und CD59a (Davies et al., 1989).

Über die Funktion der Ly6-UPAR-Proteine ist bislang nicht viel bekannt, doch kann man diese Proteinsuperfamilie grob in zwei Klassen unterteilen. Zur ersten Klasse gehören Proteine, die eine Rolle im Immunsystem spielen. Dazu gehört das zu Lypd6 schwach homologe CD59a, das von humanen, lymphoiden Zellen exprimiert wird, und ein primärer Regulator des Komplementsystem-Membranangriffskomplexes ist (Baalasubramanian et al., 2004). Oder auch die Proteine der Ly6-Familie, die eine Rolle bei der Aktivierung, Differenzierung und Reifung von T-Zellen spielen (Gumley et al., 1995) und deren Adhäsion an Endothelzellen vermitteln (Hanninen et al., 1997). Ein weiterer Vertreter dieser Klasse ist Plaur, ein Rezeptor für den Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA) und sein Proenzym pro-uPA. Es spielt eine bedeutende Rolle beim Proteinabbau während des

Gewebeumbaus und der Zellinvasion unter normalen und pathologischen Bedingungen (Behrendt et al., 1991). Zur zweiten Klasse von Ly6-UPAR-Proteinen kann man Proteine zusammenfassen, die überwiegend im Zentralnervensystem exprimiert werden oder eine Rolle bei der Modulation nikotinerger Acetylcholinrezeptorfunktion spielen. Hierzu zählen im Allgemeinen die Schlangengift α -Neurotoxine und einige Ly6-Proteine, die starke strukturelle Ähnlichkeiten zu den "Drei-Finger" Schlangenproteinen haben (Tsetlin, 1999). Eines dieser Proteine ist Lynx1, das spezifisch im Zentralnervensystem exprimiert wird und mit nikotinergen Acetylcholinrezeptoren auf Neuronen kolokalisiert und physikalisch assoziiert ist (Ibanez-Tallon et al., 2002). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass Lynx1 die Funktion von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren vom Typ $\alpha 4/\beta 2$ moduliert und die Desensibilisierung nach Acetylcholingabe erhöht (Ibanez-Tallon et al., 2002). Andere Vertreter sind Slurp1 und Slurp2. Slurp1 aktiviert auf Keratinozyten gelegene nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ $\alpha 7$ und spielt eine Rolle bei Keratinisierung und Apoptose, wohingegen Slurp2 zwar auch in Keratinozyten exprimiert wird, jedoch nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ $\alpha 3$ moduliert, Keratinozytendifferenzierung verlangsamt und Apoptose hemmt (Arredondo et al., 2006). Es gibt aber auch Vertreter der Ly6-UPAR Familie wie zum Beispiel Ly6-A, die sowohl im Hirn als auch in lymphoiden Geweben exprimiert werden (Cray et al., 1990).

Zusammen mit der Expression von Lypd6 im Zentralnervensystem deuten die Proteinhomologien von Lypd6 zu den Vertretern der Ly6-UPAR-Proteine, insbesondere den Acetylcholinrezeptormodulatoren Lynx1 und Slurp1, darauf hin, dass Lypd6 ein potentieller Modulator der Rezeptorfunktion nikotinerger Acetylcholinrezeptoren ist.

5.2 Genomische Organisation und chromosomale Lokalisierung

Die genomische Organisation des Lypd6-Gens ist bei Maus, Mensch und Zebrafisch sehr ähnlich. Die Anzahl kodierender Exone ist bei allen Spezies gleich, und abgesehen vom letzten kodierenden Exon ist auch die Länge der kodierenden Exone fast identisch. Bei allen drei Spezies ist zudem ein relativ kurzer 5'-untranslatierter Bereich auf dem ersten kodierenden Exon und ein langer 3'-untranslatierter Bereich auf dem letzten Exon vorhanden. Somit ist die genomische Organisation in der Evolution innerhalb der Vertebraten stark konserviert. Unterstützt wird dieser Befund durch Vergleiche der Lypd6-Aminosäuresequenzen zwischen Maus, Mensch und Zebrafisch, die einen sehr hohen Grad an Homologie zwischen Mensch und Maus (95,51 %), jedoch einen geringeren Grad an Homologie zwischen Mensch/Maus und Zebrafisch (ca. 70 %) zeigen. Zusammengenommen legt der starke Grad an evolutionärer Konservierung von Lypd6 auf Genebene als auch auf Proteinebene nahe, dass Lypd6 eine grundlegende Bedeutung für den Organismus hat. Da

bei *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Hefen oder Bakterien kein Lypd6 oder dazu homologes Gen existiert, ist es wahrscheinlich, dass Lypd6 erst relativ spät in der Evolution entstanden ist.

Innerhalb der Ly6-UPAR-Superfamilie sind die meisten murinen Gene durch lokale Duplikationsereignisse auf Chromosom 15 hervorgegangen. Im Gegensatz dazu sind sowohl Lypd6 als auch sein paraloges Gen (2310010M24Rik) auf Chromosom 2 gelegen. Das deutet darauf hin, dass ein gemeinsamer Vorläufer dieser beiden Gene vom ursprünglichen Segment des Ly6-UPAR-Genclusters auf Chromosom 2 getrennt wurde.

5.3 Detaillierte Analyse der Lypd6-Expression

Mit dem quantitativen Expressionsnachweis in diversen murinen Geweben zeigte sich in Hirn und Rückenmark im Vergleich zu peripheren Geweben eine deutlich höhere Expression von Lypd6. Dieser Befund wird zusätzlich getragen durch die *Northern-Blot* Analyse, in der ebenfalls im Gehirn die stärkste Expression von Lypd6 nachgewiesen wurde. Dies bestätigt deutlich die hervorgehobene Bedeutung, die Lypd6 im Zentralnervensystem zukommt.

Lypd6 wird schon in den frühen Entwicklungsstadien (E10,5 – E19,5) der murinen Hirnentwicklung exprimiert. Diese Expression erstreckt sich vor allem auf Bereiche, aus denen später Neocortex, Diencephalon und Rückenmark hervorgehen, sowie auf Strukturen wie dem germinalen Neuroepithel. In diesem sind multipotente Vorläuferzellen angesiedelt, aus denen sowohl Neurone als auch Gliazellen generiert werden können (Price et al., 1987). Diese weite kortikale Expression während der Hirnentwicklung steht im Gegensatz zu der auf einzelne Regionen beschränkten Expression im adulten Maushirn. Hier wurde eine starke Expression in tieferen Zellschichten des Cortexes und in distinkten Kerngebieten im Diencephalon nachgewiesen. Dieses Expressionsmuster ähnelt denen von Lynx1 oder dem kürzlich entdeckten Lynx2, welche auch im gesamten Cortex in den tieferen Zellschichten exprimiert werden (Dessaud et al., 2006). Andere im Zentralnervensystem exprimierte Vertreter der Ly6-UPAR Familie wie Ly6-H werden zwar ebenfalls im gesamten Cortex exprimiert, ohne jedoch auf eine bestimmte Zellschicht beschränkt zu sein (Horie et al., 1998).

Das Expressionsmuster von Lypd6 in den Zellschichten des Cortex deckt sich mit der Verteilung eines der beiden großen cholinergen Projektionssysteme, welches seinen Ursprung im basalen Vorderhirn hat und über breit angelegte Projektionen über den gesamten Cortex und Hippocampus verfügt (Dani, 2001). Eine weitere Region mit Lypd6-Expression, die zu diesem Projektionssystem gehört, ist der *Nucleus diagonalis* im präfrontalen Cortex. In dieser Hirnstruktur befinden sich cholinerge Neurone mit zahlreichen septo-hippocampalen Projektionen (Gaykema et al., 1990; Palacios, 1990a, b).

Auch im Diencephalon konnten wir eine deutliche Expression von Lypd6 in distinkten Regionen demonstrieren. Im Thalamus wurde die Expression von Lypd6 insbesondere in den medialen, zentro-lateralen und intermediodorsalen Kernen sowie im *Nucleus reuniens* nachgewiesen. Diese Kerne sind als diffuse Projektionskerne klassifiziert, die an der Steuerung der phasischen Aktivierung ('arousal') beteiligt sind (Everitt and Robbins, 1997; Jones, 1985; Paxinos, 1990). Hier befinden sich auch Neurone, die mit dem anderen der beiden großen cholinergen Projektionssysteme verbunden sind. Dieses Projektionssystem hat seinen Ursprung in Neuronen, die sich in Kerngebieten von Pons und Tegmentum befinden. Diese Expression von Lypd6 in Strukturen der beiden großen cholinergen Projektionssysteme ist konsistent mit einer putativen Rolle von Lypd6 als Modulator nikotinerger Acetylcholinrezeptoren. Zur genauen Untersuchung dieser Hypothese muss in zukünftigen Experimenten die Kolo-kalisierung von Lypd6 mit den nikotinergen Acetylcholinrezeptoren unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Ein Antikörper gegen Lypd6 existiert jedoch zurzeit nicht.

Im Hypothalamus fanden wir eine deutliche Expression von Lypd6 in medialen Kerngebieten. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von mit emotionaler Erregung assoziierten, kardiovaskulären Reaktionen (Inglefield et al., 1994). Der dorsomediale Hypothalamus wird auch zusammen mit der Amygdala und dem dorsalen Mesencephalon als bedeutender Teil eines integrierten neuronalen Netzwerkes zur Steuerung des Ausdrucks aversiver Zustände angesehen (Graeff, 1981; Roth et al., 1988). Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Lypd6 an der Steuerung oder Modulierung von 'arousal' beteiligt ist. Über die Expression anderer Gene der Ly6-UPAR-Familie im Diencephalon liegen zurzeit keine Erkenntnisse vor. Zusammengefasst lässt sich folgern, dass Lypd6 ähnlich wie *Lynx1* stark im ZNS, insbesondere in den tieferen Zellschichten des Cortex exprimiert wird, und sich das Expressionsmuster von Lypd6 in großen Teilen mit den anatomischen Korrelaten der großen cholinergen Projektionssysteme deckt.

5.4 Synapsin-Lypd6-transgene Mauslinien

Aus den Injektionen des Synapsinpromotor-Konstruktes konnten zwei exprimierende (Linie D17 und Linie D67) und eine nicht-exprimierende Mauslinie (Linie D774) gewonnen werden. Alle drei waren fertil und erzeugten transgene Nachkommen. Die Expression der Lypd6-HA mRNA war in den beiden exprimierenden Mauslinien nahezu identisch, und auch die Genotypisierungsanalyse der beiden Mauslinien zeigte ähnliche Kopienzahlen des Transgens. Wie erwartet hatten die exprimierenden Mauslinien eine Überexpression von Lypd6 in Rückenmark und Gehirn. Zusätzlich entdeckten wir in beiden Mauslinien eine schwache Überexpression von Lypd6 im Hoden. Eine Aktivität des Synapsin-Promotors im

Hoden wird auch von Street et al. beschrieben, die eine ektopische Expression von Luciferase in Spermatogonien, adulten Leydigzellen, Spermatozyten und runden Spermatiden des Hodens transgener Mäuse demonstrierten (Street et al., 2005). Da die Mauslinien D17 und D67 kaum Unterschiede in der Kopienzahl des Transgens und dessen Expression zeigten, wurde nur eine dieser beiden Linien für die weitere detaillierte Expressionsanalyse und Phänotypisierung ausgewählt. Dies war die Mauslinie D17. In diesen Tieren konnten wir eine sehr starke Überexpression (10 – 25fache Steigerung) der Lypd6-mRNA in Hirn, Rückenmark, Hinterwurzelganglien und Trigemininalganglien nachweisen. Zusätzlich konnten wir in Immunpräzipitaten von Hirn- und Rückenmarksgewebe der transgenen Tiere das Lypd6-HA Fusionsprotein belegen und somit mit den neuronal überexprimierenden Tieren der Mauslinie D17 ein transgenes Modell zur Funktionsanalyse des Lypd6-Gens in Nervenzellen etablieren.

Durch *in situ*-Hybridisierung fanden wir in transgenen Tieren neben der Überexpression in Regionen mit endogener Lypd6-Expression eine starke ektopische Expression im gesamten Gehirn. Als mögliche Konsequenz hieraus ergibt sich, dass Lypd6 in den transgenen Tieren mit Neurotransmittersystemen interagieren könnte, die keinen realen Bezug zu der tatsächlichen Funktion von Lypd6 im Nervensystem haben. Daraus folgt, dass sich die pharmakologische Analyse der transgenen Tiere auf mehrere Neurotransmittersysteme erstrecken muss.

5.4.1 Verhaltensanalyse

Mit dem Verhaltenstest nach Irwin konnten keinerlei Auffälligkeiten in den Lypd6-Transgenen entdeckt werden. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da diese Testbatterie zur Identifizierung und Unterscheidung der Wirkweisen pharmakologischer Wirkstoffe entwickelt wurde und dazu konzipiert war, Verhalten und physiologische Zustände von Mäusen nach Verabreichung therapeutischer Dosen dieser Wirkstoffe zu quantifizieren (Irwin 1968). Die mit der Verabreichung solcher Dosen einhergehenden Verhaltensänderungen sind oft tiefgehender als die meisten Veränderungen, die auf genetischen Manipulationen beruhen.

Sobald die Lypd6-Transgenen aus dem Heimatkäfig in eine für sie neue Situation gebracht wurden, konnten wir bei ihnen eine deutlich gesteigerte lokomotorische Aktivität feststellen. Im Offenfeld verbrachten die transgenen Tiere mehr Zeit in Bewegung, bewegten sich schneller als die Wildtyptiere und legten eine längere Strecke über die gesamte Dauer des Beobachtungszeitraums zurück. Diese hyperlokomotorische Verhaltensantwort manifestierte sich auch in allen anderen Verhaltensexperimenten, in denen die Tiere die Möglichkeit hatten eine für sie neue Umgebung zu erkunden. Diese lokomotorische Aktivität ist jedoch nicht Ausdruck eines gesteigerten explorativen Verhaltens, da wir im Offenfeld keine Unterschiede diesbezüglich zwischen Wildtyptieren und transgenen Tieren finden konnten.

Da die Lypd6-Transgenen keine erhöhte lokomotorische Aktivität im Heimatkäfig zeigten, kann diese hyperlokomotorische Reaktion auch nicht lediglich auf eine tonische Hyperaktivität, sondern eher auf die Reaktion der Tiere auf die von ihnen als neuartig empfundene experimentelle Umgebung zurückgeführt werden. Unsere Hypothese lautet, dass die transgenen Tiere durch die Neuartigkeit der Situation in einem viel stärkeren Ausmaß als die Wildtypiere in einen Aktivierungszustand versetzt wurden, der sich als hyperlokomotorisches Verhalten manifestierte (Crabbe, 1986; Grailhe et al., 1999). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch den Umstand, dass wir eine endogene Lypd6-Expression in Hirnregionen demonstrieren konnten, die an der Steuerung von Aktivierungszuständen beteiligt sind. Eine erhöhte lokomotorische Verhaltensantwort auf neuartige Situationen ist zudem konsistent mit einem gesteigerten cholinergen Tonus in den Lypd6-Transgenen (Abreu-Villaca et al., 2006).

Überexpression von Lypd6 führte zwar zu keiner veränderten somatischen spinalen oder supraspinalen Verarbeitung phasischer thermisch schmerzhafter Reize im *Tail-flick* und *Hot plate* Test, jedoch konnten wir eine deutlich reduzierte Schmerzantwort bei Lypd6-Transgenen im *Writhing*-Test nachweisen. Die im *Tail-flick* und *Hot plate* Test applizierten thermischen Schmerzreize aktivieren sensorische Neuronen, deren Zellkörper in den Hinterwurzelganglien liegen. Beim *Tail-flick* Test wird durch diese Stimulierung direkt ein spinaler Reflex ausgelöst, wohingegen beim *Hot plate* Test zu dieser rein spinalen Verarbeitung noch eine supraspinale Reaktionskomponente hinzu kommt (Caggiula et al., 1995; D'Amour and Smith, 1941). Thermische Reize wie sie im *Tail-flick* und *Hot plate* Test eingesetzt wurden, werden über A δ - und C-Schmerzfasern zum dorsalen Horn des Rückenmarks weitergeleitet, wo sie Synapsen mit spino-thalamischen Neuronen bilden, die den Schmerzreiz über den medialen *Lemniscus* in supraspinale Strukturen weiterleiten (Kandel et al., 2000). Diese Weiterleitung wird noch im dorsalen Horn postsynaptisch und am Soma der spino-thalamischen Neurone durch Interneurone und deszendierende Signale aus dem Hirnstamm moduliert (Schmidt et al., 2000). Bei dieser Modulierung sind insbesondere nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ $\alpha 4/\beta 2$ beteiligt, obgleich auch eine Beteiligung von $\alpha 3/\beta 4$ Acetylcholinrezeptoren beschrieben wird (Decker et al., 2004; Rashid et al., 2006). Im Detail erfolgt diese Modulierung über präsynaptische Bahnung inhibitorischer Interneurone. Der *Writhing* Test erfasst im Gegensatz zu den oben genannten Tests neben der spinalen Schmerzverarbeitung auch vegetative Komponenten derselben und ist klinisch wesentlich bedeutsamer als der *Tail-flick* oder *Hot plate* Test (Le Bars et al., 2001). Auch hier wird die Weiterleitung im Rückenmark durch deszendierende Fasern und Interneurone moduliert. Ein neurochemischer Unterschied zwischen der Weiterleitung thermischer und viszeraler Schmerzreize liegt darin, dass die A δ - und C-Schmerzfasern der Hinterwurzelganglien Substanz P, Glutamat und Dynorphin als Neurotransmitter im

Rückenmark haben. Die autonomen Ganglien der viszerale Schmerzfasern haben jedoch Acetylcholin als Transmitter. Aus der deutlich reduzierten Empfindung von intestinalem inflammatorischen Schmerz bei den Lypd6-Transgenen folgern wir, dass sich die Überexpression von Lypd6 direkt auf die Empfindung viszeraler Schmerzen über die sensorischen Afferenzen und deren cholinerg Neurotransmission auswirkt und eher keinen Einfluss auf die Neurotransmission thermaler Schmerzreize im dorsalen Horn des Rückenmarks hat. Möglicherweise spielt Lypd6 aber auch eine Rolle bei der Modulation rein viszeraler Schmerzempfindung. Somit kommt Lypd6 eine tragende Rolle bei der Empfindung viszeralen Schmerzes zu. Dies lässt die Frage offen, ob und welche Rolle Lypd6 bei der Modulation der Schmerzweiterleitung im Rückenmark spielt.

Lypd6-Transgene zeigten eine gesteigerte Präpulsinhibition (PPI) und somit ein verändertes sensorimotorisches *Gating*. Pharmakologische Untersuchungen zur PPI in Mäusen führen auf, dass eine erhöhte PPI mit Nikotin, Raclopride, einem D2-Dopaminrezeptor-Antagonisten oder 8-OH-DPAT, einem 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptor-Agonisten, herbeigeführt werden kann (Dulawa and Geyer, 2000; McCaughan et al., 1997; Stevens and Wear, 1997). Dies deutet darauf hin, dass cholinerge, serotonerge und dopaminerge Neurotransmission eine bedeutende Rolle bei der PPI spielt und möglicherweise bei den transgenen Tieren diese Systeme moduliert sind.

Bei der Untersuchung von territorialer Aggressivität und der Leistung des Arbeitsgedächtnisses konnten wir bei Lypd6-Transgenen keine Unterschiede zu Wildtyptieren feststellen.

Die Analyse des Angstverhaltens im Offenfeld ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Zwar suchten die transgenen Tiere deutlich häufiger das Zentrum des Offenfeldes auf, jedoch verbrachten sie dort gleich viel Zeit wie die Wildtyptiere. Das häufige Aufsuchen des Zentrums ist bei den Transgenen vielmehr ein weiterer Ausdruck ihrer hyperlokomotorischen Aktivität. Aus diesem Grund analysierten wir das Angstverhalten der Lypd6-Transgenen auch in dem situationsunabhängigen *Startle*-Test. Jedoch konnten wir auch hier keine Hinweise für ein gesteigertes Angstverhalten der transgenen Tiere finden.

Zusammengenommen legen diese Befunde nahe, dass sich die transgenen Tiere konsistent zu einem erhöhten cholinergen Tonus verhielten und somit Lypd6 als ein Modulator cholinerg Neurotransmission anzusehen ist, der bei Verhaltensweisen wie Lokomotion, sensomotorischem *Gating* und Schmerzempfindung eine Rolle spielt.

5.4.2 Pharmakologische und physiologische Analyse

In den von uns durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen der transgenen Tiere fanden wir mehrere direkte Belege für die Funktion von Lypd6 als Modulator cholinerg

Neurotransmission. Zuerst führten wir pharmakologische Untersuchungen der Nozizeption in mehreren Schmerzparadigmen unter Verwendung von Nikotin durch. Im *Tail-flick* Test verzeichneten wir eine deutliche und signifikante Verschiebung der Dosiswirkungskurve von Nikotin für die Synapsin-Lypd6 transgenen Tiere, was gleichbedeutend mit einer stärkeren anti-nozizeptiven Wirkung von Nikotin ist. Dieser Effekt kann nur durch Modulation auf spinaler Ebene und nicht durch eine veränderte Schmerzempfindung erklärt werden, da im *Tail-flick* Test in der Salinebedingung kein Unterschied zwischen Transgenen und Wildtyptieren gefunden wurde. Die Experimente zur Nikotin-induzierten Analgesie bei viszerale Schmerzen (*Writhing*) unterstützen dies deutlich. Neben der unterschiedlichen Schmerzempfindung fanden wir hier auch unterschiedliche Reaktionen auf die Nikotinverabreichung. Dies weist auf eine stärkere Modulation der Schmerzreaktion bei transgenen Tieren hin. Die transgenen Tieren reagierten deutlich empfindlicher auf die Verabreichung von Nikotin als die Wildtyptiere und zeigten schon bei einer Dosis von 0,25 mg/kg Nikotin den maximal analgetischen Effekt, welcher sich bei den Wildtyptieren jedoch erst bei einer Dosis von 1 mg/kg einstellte. Neben dem vorher beschriebenen dorsalen Horn des Rückenmarks sind supraspinal der Thalamus, *Nucleus raphe magnus* und die pedunculopontinen tegmentalen *Nuclei* wichtige Strukturen für die antinozizeptive Wirkung von Nikotin (Bitner et al., 1998; Jurna et al., 1993). Diese Kerne sind an der supraspinalen Verhaltensreaktion im *Hot plate* Test beteiligt. Im *Hot plate* Test wurde jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen in der Reaktion auf Nikotingabe festgestellt. Überhaupt konnte im *Hot plate* Test kein zum *Tail-flick* vergleichbarer Effekt der Nikotingabe gezeigt werden. Daher lässt sich aus diesem Test keine sichere Aussage machen. Möglicherweise beschränkt sich jedoch der Nikotin-bezogene Phänotyp der Synapsin-Lypd6 Tiere auf spinale und viszerale Neurotransmission und nicht auf die beim *Hot plate* Test beteiligten supraspinalen Kerne.

Durch direkte Messungen Nikotin-induzierter Ströme mithilfe von *Ganzzell-Patch-Clamp* Ableitungen fanden wir eine klare Bestätigung der verhaltenspharmakologischen Befunde. Nach Applikation von Nikotin wurden in trigeminalen Neuronen der transgenen Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren deutlich erhöhte Calcium-Stromkomponenten gemessen. Dieser Befund ist klar abzugrenzen von den Untersuchungen zu den beiden anderen endogenen Modulatoren cholinerg Neurotransmission, Slurp und Lynx1, da die Gesamtströme nach Nikotingabe keine Unterschiede zwischen Wildtyptieren und transgenen Mäusen aufwiesen. Die Funktion von Lypd6 bei Agonisten-induzierten Calciumströmen nikotinerger Acetylcholinrezeptoren ist konsistent mit der wichtigsten Funktion nikotinerger Acetylcholinrezeptoren im ZNS, der Beeinflussung der Freisetzung von anderen Neurotransmittern. Präsynaptische nikotinerge Acetylcholinrezeptoren beeinflussen über die

Ca-Ströme die Freisetzung anderer Neurotransmitter am synaptischen Spalt oder können über Ca als *second messenger* eine länger anhaltende präsynaptische Bahnung bewirken. Um zu klären, ob die Lypd6-Transgenen als Modelle für ADHD (*'attention deficit hyperactivity disorder'*) dienen können und zu analysieren, ob bei diesen Tieren auch eine Veränderung des katecholaminergen Neurotransmittersystems eingetreten ist, wurde ihr Verhalten im Offenfeld nach Verabreichung von Methylphenidat und Amphetamin analysiert. Hyperlokomotorisches Verhalten im Offenfeld wird zusammen mit defizitärem Aufmerksamkeitsverhalten, erhöhter Impulsivität und beeinträchtigter Lernleistung als Merkmal für ADHD diskutiert (Barkley, 1997; Barkley et al., 1992; Stein et al., 1995). Ein weiteres Merkmal von ADHD diagnostizierten Personen ist der so genannte paradoxe Beruhigungseffekt, der bei diesen Patienten durch ansonsten psychostimulatorische Drogen hervorgerufen wird (Robbins and Sahakian, 1979). Dieses Phänomen konnte auch bei zahlreichen Tiermodellen für ADHD gefunden werden. Zu diesen Tiermodellen zählen hyperdopaminerge Mausmodelle wie die Dopamintransporter-Knockoutmäuse (Gainetdinov et al., 1999; Zhuang et al., 2001) oder aber auch transgene Mäuse, die einen defizitären β -Thyroidrezeptor exprimieren (McDonald et al., 1998). Methylphenidat hat geringere toxische Nebenwirkungen auf Dopamin- und Serotoninrezeptoren als Amphetamin und wird unter anderem deshalb auch eher als Medikament eingesetzt (Wagner et al., 1980). Wir konnten jedoch keine Veränderungen des dopaminergen Neurotransmittersystems für die transgenen Tiere nachweisen. In der Reaktion auf Methylphenidat im Offenfeld zeigten die transgenen Tiere keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyptieren. Methylphenidat bewirkte bei Wildtyptieren und transgenen Tieren gleichermaßen eine Stimulation der lokomotorischen Aktivität. Somit kann ein Modellcharakter der transgenen Tiere für ADHD ausgeschlossen werden. Wir fanden jedoch deutlich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in der Salinebedingung. Dieser Unterschied in der Salinegruppe unterstreicht noch einmal den Hyperlokomotionsphänotyp der transgenen Tiere im Offenfeld. Der Unterschied zwischen Transgenen und Wildtyptieren in der prozentualen Steigerung der Basisaktivität bei 10 mg/kg Methylphenidat reflektiert die Tatsache, dass die bei dieser Dosis erreichte lokomotorische Aktivierung das physiologische Maximum der Lokomotion für beide Gruppen darstellt. Dieser Unterschied ist lediglich auf die Verschiedenheiten der Basisaktivitäten zurückzuführen. Es handelt sich demzufolge hierbei um Deckeneffekte. Da beide Gruppen keine Unterschiede in der Reaktion auf die Verabreichung von Methylphenidat zeigten, ist eine veränderte katecholaminerge Neurotransmission bei den transgenen Tieren eher unwahrscheinlich. Weil Methylphenidat jedoch relativ unspezifische Effekte auf die katecholaminerge Neurotransmission hat, also nicht nur als indirekter Agonist für Dopaminrezeptoren, sondern auch als indirekter Agonist für Noradrenalinrezeptoren wirkt, wurde der Effekt von Amphetamin auf die lokomotorische Aktivität von Transgenen und Wildtyptieren untersucht.

Die Wirkungsweise von Amphetamin ist der des Methylphenidats ähnlich. Amphetamin bindet mit hoher Affinität an Katecholamintransporter in der Plasmamembran dopaminerger, noradrenerger und adrenerger Neuronen und wirkt somit als indirekter Agonist für Dopamin- und Noradrenalinrezeptoren (Forth et al., 1998). Seine eigentliche Wirkung entfaltet Amphetamin jedoch an präsynaptischen Vesikeln, wo es den vesikulären pH-Gradienten verändert, somit Dopamin zum Zytosol zurückverteilt, den reversen Transport und somit die Dopaminfreisetzung fördert (Sulzer et al., 1995). Die Gabe von Amphetamin führt zu Hyperlokomotion und Stereotypen (Asghar et al., 1989). Ähnlich wie bei der Verabreichung von Methylphenidat entdeckten wir nach Gabe von Amphetamin keine bedeutenden Unterschiede zwischen Transgenen und Wildtyp-Tieren. Auch hier fanden wir einen deutlichen hyperlokomotorischen Phänotyp in den Saline-behandelten transgenen Tieren. Ähnlich wie bei den Experimenten mit Methylphenidat erklärten sich die Unterschiede nach Amphetamingabe zwischen den Genotypen durch Deckeneffekte, die durch physiologische Einschränkungen der Zunahme lokomotorischer Aktivierung zustandekommen und zudem erst bei höheren Dosierungen eintreten.

Auch Veränderungen des glutamatergen Systems in den transgenen Tieren können ausgeschlossen werden. Zur Analyse des glutamatergen Systems untersuchten wir den Einfluss von PCP, eine weitere psychostimulatorische Droge mit aktivierender Wirkung auf lokomotorisches Verhalten, auf die Lypd6-Transgenen. Die psychotomimetischen Effekte von PCP werden von einer Bindestelle für PCP im glutamatergen NMDA-Rezeptor vermittelt. PCP wird hauptsächlich als non-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist (Kanalblocker) betrachtet (De Souza et al., 1993). PCP hat eine analgetische, psychotrope (z.B. Euphorie und Erregung) und neurologische (Nystagmus, Ataxie und Dysarthrie) Wirkung (Forth et al., 1998). Bei *Rodentia* induziert PCP Dopamin-unabhängige, stereotypische motorische Aktivität und Hyperlokomotion (Takahata and Moghaddam, 2003). Auch nach der Verabreichung von PCP entdeckten wir keine bedeutenden Unterschiede zwischen Transgenen und Wildtyp-Tieren. Es wurde wieder ein deutlicher hyperlokomotorischer Phänotyp in den Saline-behandelten transgenen Tieren gefunden. Ähnlich wie bei den Experimenten mit Methylphenidat und Amphetamin konnten die Unterschiede nach PCP-Gabe zwischen den Genotypen durch Deckeneffekte erklärt werden, die durch physiologische Einschränkungen der Zunahme lokomotorischer Aktivierung zustandekommen. Hinzu kommt, dass PCP eine so genannte 'schmutzige' Droge ist, dies bedeutet, dass PCP gerade bei höheren Dosierungen Effekte auf zahlreiche Neurotransmittersysteme hat. Dazu zählen dopaminerge Agonisteneffekte, komplexe Wirkungen auf nikotinerge und muskarinische Acetylcholinrezeptoren sowie Interaktionen mit noradrenerger und serotonerger Neurotransmission (Johnson and Jones, 1990). Dementsprechend sind PCP-Effekte gerade bei höheren Dosierungen sehr schwer interpretierbar.

Zusätzlich wurden auch Experimente zur Untersuchung der Nikotin-induzierten Hypolokomotion durchgeführt. Hier entdeckten wir jedoch keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Problematisch bei verhaltenspharmakologischen Untersuchungen im Offenfeld ist jedoch der Umstand, dass lokomotorisches Verhalten dort von vielen unterschiedlichen Faktoren bedingt wird. So konnte zum Beispiel für Mäuse gezeigt werden, dass mindestens 10 verschiedene Gene einen Einfluss auf die Aktivität in Testboxen ausüben (Flint et al., 1995). Dementsprechend werden kleinere Effekte einzelner Komponenten der lokomotorischen Aktivität oft verdeckt und können nur schwer nachgewiesen werden.

Alles in allem demonstrieren die pharmakologischen Untersuchungen eine spezifische Modulation des cholinergen Systems in den Lypd6-Transgenen. Ektopische Effekte der Überexpression in anderen Transmittersystemen sind eher unwahrscheinlich. Die von uns gefundene deutlich veränderte nikotinerge Neurotransmission bei den transgenen Tieren steht in einem direkten Bezug zu der spezifischen endogenen Expression von Lypd6 im Rückenmark und der starken Überexpression von Lypd6 im Rückenmark neuronal-überexprimierender Tiere. Die elektrophysiologischen Untersuchungen legen nahe, dass ein möglicher Mechanismus der Wirkweise von Lypd6 die Ca-abhängige Steuerung präsynaptischer Neurotransmitterfreisetzung oder präsynaptischer Bahnung ist.

5.5 Expressionsreduktion von Lypd6 in siRNA-Transgenen

Aus den Untersuchungen der siRNA-Transgenen folgern wir, dass sich die Expressionsreduktion aller Wahrscheinlichkeit schädlich auf die Embryonal- und/oder Gametenentwicklung auswirkt. Aus den Pronukleusinjektionen des siRNA-Expressionskonstrukts gingen zwar sowohl männliche als auch weibliche transgene Tiere hervor, jedoch erzeugten diese nur wenige transgenene Nachkommen. Zudem konnten sich diese transgenen Nachkommen nicht weiter fortpflanzen. Dies ist wahrscheinlich auf eine Mosaikexpression des Transgens zurückzuführen (Palmiter et al., 1984). Aus diesen Gründen konnten wir keine Phänotypbestimmung dieser Mauslinien durchführen. Als Konsequenz hieraus ergibt sich die Notwendigkeit induzierbarer Knockdown- oder Knockout-Strategien für zukünftige Analysen der Funktion von Lypd6 in Mausmutanten.

5.6 Ausblicke

In dieser Arbeit sind drei mögliche Funktionen von Lypd6, nämlich die Beteiligung an Lokomotion, Schmerzempfindung und Modulation nikotinerger Acetylcholinrezeptoren identifiziert worden. Diese Funktionen ergeben sich aus dem ihnen gemeinsam zugrunde liegenden erhöhten cholinergen Tonus bei den neuronal überexprimierenden Tieren.

Insbesondere die letztgenannte Funktion muss zur genauen Untersuchung von Mechanismen noch eingehender untersucht werden. Hierbei gilt der Überprüfung der Hypothese zur Wirkweise über veränderte präsynaptische Bahnung besonderes Augenmerk. Durch die deutliche Reduktion der Schmerzreaktionen der Transgenen im *Writhing*-Test eröffnet sich mit der weiteren Erforschung dieses endogenen Modulators nikotinerger Acetylcholinrezeptoren eine potentielle klinische Anwendung der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse (Decker et al., 1995). Es sind transgene Mauslinien auf dem genetischen Hintergrund des FVB/N-Stammes hergestellt worden. Dieser Stamm ist ideal für die Herstellung von transgenen Tieren, aber nicht für Untersuchungen von Verhaltensweisen bezüglich Lernen oder Gedächtnis (Mineur and Crusio, 2002; Pugh et al., 2004; Voikar et al., 2001). Dies sind jedoch Verhaltensaspekte, die für eine tiefergehende Untersuchung der Rolle von Lypd6 als Modulator des cholinergen Systems zusätzliches Augenmerk verdienen. Deshalb sollte die Herstellung von transgenen Mäusen mit neuronaler Überexpression von Lypd6 ausgehend von einem anderen genetischen Hintergrund wiederholt werden. Alternativ könnte man FVB/N-Hybride mit geeigneten anderen Mausstämmen züchten.

Die Analyse der *Knockdown*-Transgenen legt nahe, Mauslinien mit induzierbarem *Knockdown* oder auch *Knockout* zu generieren und mit deren Hilfe mehr über die Funktion von Lypd6 zu erfahren. In dem Zusammenhang ist auch die Etablierung eines spezifischen Antikörpers gegen das Lypd6-Protein unabdingbar. So könnte man auch die Frage der Koexpression von Lypd6 und diversen nikotinergen Acetylcholinrezeptoren klären. Denkbar sind auch Coimmunopräzipitationsstudien, mit denen die physikalische Interaktion von Lypd6 mit einzelnen Untereinheiten von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren untersucht werden könnte.

Für eine genaue mechanistische Funktionsbestimmung von Lypd6 wäre es sehr hilfreich, Interaktionspartner von Lypd6 zu kennen. Diese könnten mit *TwoHybrid*-Experimenten identifiziert werden. Die Identifizierung von wirksamen siRNA Molekülen zur Repression der Lypd6-Expression in dieser Arbeit stellt zusätzlich nützliche molekularbiologische Werkzeuge zur Verfügung, mit denen *in vitro* weitere Analysen zur Funktion oder zu Mechanismen von Lypd6 durchgeführt werden können.

6. Zusammenfassung

Lypd6 ist ein im ZNS exprimiertes Gen aus der Schlangengift-Neurotoxin Superfamilie. Das Lypd6 Protein zeigt eine mäßig starke Homologie zu den endogenen Modulatoren nikotinerger Acetylcholinrezeptoren Lynx1 und Surp1.

In der Embryonalentwicklung wird Lypd6 ab Tag 11,5 in Strukturen des ZNS exprimiert, aus denen später Rückenmark, Neocortex und Diencephalon hervorgehen. Die Expression von Lypd6 im adulten Nervensystem erstreckt sich auf die Hinterwurzelganglien, Trigeminalganglien, das Rückenmark, den cerebralen Cortex und einzelne Strukturen wie den *Nucleus diagonalis* im Vorderhirn oder Kerngebiete im medialen Thalamus und dorsolateralen Hypothalamus. Dieses Expressionsprofil ähnelt stark der Lynx1-Expression und platziert Lypd6 innerhalb zahlreicher Kerngebiete der cholinergen Projektionssysteme.

Zur genaueren Analyse der Funktion von Lypd6 wurde das Gen in Neuronen transgener Mauslinien überexprimiert. Bei der Verhaltensanalyse dieser Mauslinie zeigte sich eine signifikante Steigerung von Neuigkeits-induzierter Lokomotion im Offenfeld und im Y-Labyrinth. Auch konnte eine leicht gesteigerte Präpulsinhibition durch die Überexpression von Lypd6 nachgewiesen werden. Klinisch bedeutsam ist der Befund, dass die Überexpression von Lypd6 in Neuronen eine geringere Sensitivität auf viszerale Schmerzreize im *Writhing*-Test bewirkte. All diese Verhaltensweisen sind Anhaltspunkte für einen erhöhten cholinergen Tonus in den transgenen Tieren. Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen gesteigerter Sensitivität auf die analgetische Wirkung von Nikotin und der (Über-) Expression von Lypd6.

Elektrophysiologische *Patch-clamp* Untersuchungen bestätigen eine gesteigerte Nikotin-Sensitivität Lypd6-überexprimierender Neurone und belegen zudem, dass sich die Lypd6-Überexpression exklusiv auf die Calcium-Komponente von Strömen durch nikotinerge Acetylcholinrezeptoren auswirkt. Zusammengenommen belegen diese Untersuchungen den erhöhten cholinergen Tonus in den Tieren mit Lypd6-Überexpression und identifizieren Lypd6 somit als Modulator nikotinerger Acetylcholinrezeptoren.

In dieser Arbeit wurden Hinweise auf eine gestörte Embryonal- und/oder Gametenentwicklung in Lypd6-defizienten Mauslinien gefunden. Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Lypd6-Funktion sind weiterführende Untersuchungen erforderlich. Die in dieser Arbeit beschriebenen ersten Untersuchungen zur Rolle von Lypd6 sind dazu eine wichtige Voraussetzung.

7. Literaturverzeichnis

Abreu-Villaca, Y., Queiroz-Gomes Fdo, E., Dal Monte, A.P., Filgueiras, C.C., and Manhaes, A.C. (2006). Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 167, 175-182.

Adermann, K., Wattler, F., Wattler, S., Heine, G., Meyer, M., Forssmann, W.G., and Nehls, M. (1999). Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily. *Protein Sci* 8, 810-819.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.

Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R., and Lodge, D. (1983). The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol* 79, 565-575.

Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Jolkovsky, D.L., Webber, R.J., and Grando, S.A. (2006). SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium. *J Cell Physiol* 208, 238-245.

Asghar, K., De Souza, E.B., and National Institute on Drug Abuse. (1989). Pharmacology and toxicology of amphetamine and related designer drugs (Rockville, MD Washington, DC: U.S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service Alcohol Drug Abuse and Mental Health Administration National Institute on Drug Abuse ; For sale by the Supt. of Docs. U.S. G.P.O.).

Baalasubramanian, S., Harris, C.L., Donev, R.M., Mizuno, M., Omidvar, N., Song, W.C., and Morgan, B.P. (2004). CD59a is the primary regulator of membrane attack complex assembly in the mouse. *J Immunol* 173, 3684-3692.

Bamezai, A., and Rock, K.L. (1995). Overexpressed Ly-6A.2 mediates cell-cell adhesion by binding a ligand expressed on lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4294-4298.

Barkley, R.A. (1997). Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychological bulletin* 121, 65-94.

Barkley, R.A., Grodzinsky, G., and DuPaul, G.J. (1992). Frontal lobe functions in attention deficit disorder with and without hyperactivity: a review and research report. *Journal of abnormal child psychology* 20, 163-188.

- Behrendt, N., Ploug, M., Patthy, L., Houen, G., Blasi, F., and Dano, K. (1991). The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 266, 7842-7847.
- Bischoff, C., Kahns, S., Lund, A., Jorgensen, H.F., Praestegaard, M., Clark, B.F., and Leffers, H. (2000). The human elongation factor 1 A-2 gene (EEF1A2): complete sequence and characterization of gene structure and promoter activity. *Genomics* 68, 63-70.
- Bitner, R.S., Nikkel, A.L., Curzon, P., Arneric, S.P., Bannon, A.W., and Decker, M.W. (1998). Role of the nucleus raphe magnus in antinociception produced by ABT-594: immediate early gene responses possibly linked to neuronal nicotinic acetylcholine receptors on serotonergic neurons. *J Neurosci* 18, 5426-5432.
- Caggiula, A.R., Epstein, L.H., Perkins, K.A., and Saylor, S. (1995). Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 122, 301-306.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., *et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.
- Civelli, O., Nothacker, H.P., Saito, Y., Wang, Z., Lin, S.H., and Reinscheid, R.K. (2001). Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 24, 230-237.
- Crabbe, J.C. (1986). Genetic differences in locomotor activation in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 25, 289-292.
- Cray, C., Keane, R.W., Malek, T.R., and Levy, R.B. (1990). Regulation and selective expression of Ly-6A/E, a lymphocyte activation molecule, in the central nervous system. *Brain research* 8, 9-15.
- D'Amour, F.E., and Smith, D.L. (1941). A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72, 74-79.
- Dani, J.A. (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49, 166-174.
- Davies, A., Simmons, D.L., Hale, G., Harrison, R.A., Tighe, H., Lachmann, P.J., and Waldmann, H. (1989). CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells,

regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 170, 637-654.

Davis, M., Falls, W.A., Campeau, S., and Kim, M. (1993). Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 58, 175-198.

Davis, M., Gendelman, D.S., Tischler, M.D., and Gendelman, P.M. (1982). A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J Neurosci* 2, 791-805.

De Souza, E.B., Clouet, D.H., London, E.D., and National Institute on Drug Abuse. (1993). Sigma, PCP, and NMDA receptors (Rockville, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service Substance Abuse and Mental Health Services Administration National Institute on Drug Abuse).

de Wied, D. (1974). Pituitary peptides and behaviour: influence on motivational, learning and memory processes. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser* 359, 653-658.

Decker, M.W., Brioni, J.D., Bannon, A.W., and Arneric, S.P. (1995). Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life sciences* 56, 545-570.

Decker, M.W., Rueter, L.E., and Bitner, R.S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class of analgesics. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 369-384.

Dessaud, E., Salaun, D., Gayet, O., Chabbert, M., and deLapeyriere, O. (2006). Identification of lynx2, a novel member of the ly-6/neurotoxin superfamily, expressed in neuronal subpopulations during mouse development. *Mol Cell Neurosci* 31, 232-242.

Dulawa, S.C., and Geyer, M.A. (2000). Effects of strain and serotonergic agents on prepulse inhibition and habituation in mice. *Neuropharmacology* 39, 2170-2179.

Eddy, N.B., and Leimbach, D. (1953). Synthetic Analgesics. II. Dithienylbutenyl-and Dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 107, 385-393.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annual review of psychology* 48, 649-684.

- Fleming, T.J., O'Huigin, C., and Malek, T.R. (1993). Characterization of two novel Ly-6 genes. Protein sequence and potential structural similarity to alpha-bungarotoxin and other neurotoxins. *J Immunol* 150, 5379-5390.
- Flint, J., Corley, R., DeFries, J.C., Fulker, D.W., Gray, J.A., Miller, S., and Collins, A.C. (1995). A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science* 269, 1432-1435.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., and Starke, K. (1998). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. edn (Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag).
- Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Levin, E.D., Jaber, M., and Caron, M.G. (1999). Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283, 397-401.
- Gao, X., and Zhang, P. (2007). Transgenic RNA interference in mice. *Physiology* (Bethesda, Md 22, 161-166.
- Gaykema, R.P., Luiten, P.G., Nyakas, C., and Traber, J. (1990). Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* 293, 103-124.
- Glaser, S., Anastassiadis, K., and Stewart, A.F. (2005). Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet* 37, 1187-1193.
- Graeff, F.G. (1981). Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al* 14, 239-265.
- Grailhe, R., Waeber, C., Dulawa, S.C., Hornung, J.P., Zhuang, X., Brunner, D., Geyer, M.A., and Hen, R. (1999). Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT(5A) receptor. *Neuron* 22, 581-591.
- Grimmond, S.M., Miranda, K.C., Yuan, Z., Davis, M.J., Hume, D.A., Yagi, K., Tominaga, N., Bono, H., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., and Teasdale, R.D. (2003). The mouse secretome: functional classification of the proteins secreted into the extracellular environment. *Genome Res* 13, 1350-1359.
- Gumley, T.P., McKenzie, I.F., and Sandrin, M.S. (1995). Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. *Immunology and cell biology* 73, 277-296.

- Gustincich, S., Batalov, S., Beisel, K.W., Bono, H., Carninci, P., Fletcher, C.F., Grimmond, S., Hirokawa, N., Jarvis, E.D., Jegla, T., *et al.* (2003). Analysis of the mouse transcriptome for genes involved in the function of the nervous system. *Genome Res* 13, 1395-1401.
- Hanninen, A., Jaakkola, I., Salmi, M., Simell, O., and Jalkanen, S. (1997). Ly-6C regulates endothelial adhesion and homing of CD8(+) T cells by activating integrin-dependent adhesion pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6898-6903.
- Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T., and Okabe, M. (2002). Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 532, 227-230.
- Horie, M., Okutomi, K., Taniguchi, Y., Ohbuchi, Y., Suzuki, M., and Takahashi, E. (1998). Isolation and characterization of a new member of the human Ly6 gene family (LY6H). *Genomics* 53, 365-368.
- Ibanez-Tallon, I., Miwa, J.M., Wang, H.L., Adams, N.C., Crabtree, G.W., Sine, S.M., and Heintz, N. (2002). Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1. *Neuron* 33, 893-903.
- Inglefield, J.R., Schwarzkopf, S.B., and Kellogg, C.K. (1994). Alterations in behavioral responses to stressors following excitotoxin lesions of dorsomedial hypothalamic regions. *Brain Res* 633, 151-161.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 13, 222-257.
- Johnson, K.M., and Jones, S.M. (1990). Neuropharmacology of phencyclidine: basic mechanisms and therapeutic potential. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 707-750.
- Jones, E.G. (1985). *The thalamus* (New York: Plenum Press).
- Jurna, I., Krauss, P., and Baldauf, J. (1993). Depression by nicotine of pain-related nociceptive activity in the rat thalamus and spinal cord. *The Clinical investigator* 72, 65-73.
- Kanapin, A., Batalov, S., Davis, M.J., Gough, J., Grimmond, S., Kawaji, H., Magrane, M., Matsuda, H., Schonbach, C., Teasdale, R.D., and Yuan, Z. (2003). Mouse proteome analysis. *Genome Res* 13, 1335-1344.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (2000). *Principles of neural science*, 4th edn (New York: McGraw-Hill, Health Professions Division).

- Koster, R., Anderson, M., and de Beer, E.J. (1959). Acetic acid for analgesic Screening. *Federation Proc* 18, 412.
- Kubista, M., Akerman, B., and Norden, B. (1987). Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26, 4545-4553.
- Kuczenski, R., Leith, N.J., and Applegate, C.D. (1983). Striatal dopamine metabolism in response to apomorphine: the effects of repeated amphetamine pretreatment. *Brain Res* 258, 333-337.
- Kumari, V., Soni, W., Mathew, V.M., and Sharma, T. (2000). Prepulse inhibition of the startle response in men with schizophrenia: effects of age of onset of illness, symptoms, and medication. *Arch Gen Psychiatry* 57, 609-614.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Le Bars, D., Gozariu, M., and Cadden, S.W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53, 597-652.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Maeda, N., Kasukawa, T., Oyama, R., Gough, J., Frith, M., Engstrom, P.G., Lenhard, B., Aturaliya, R.N., Batalov, S., Beisel, K.W., *et al.* (2006). Transcript annotation in FANTOM3: mouse gene catalog based on physical cDNAs. *PLoS genetics* 2, e62.
- Mallya, M., Campbell, R.D., and Aguado, B. (2006). Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands. *Protein Sci* 15, 2244-2256.
- Marshall, E. (2002). Genome sequencing. Public group completes draft of the mouse. *Science* 296, 1005.
- McCaughran, J., Jr., Mahjubi, E., Decena, E., and Hitzemann, R. (1997). Genetics, haloperidol-induced catalepsy and haloperidol-induced changes in acoustic startle and prepulse inhibition. *Psychopharmacology (Berl)* 134, 131-139.

- McDonald, M.P., Wong, R., Goldstein, G., Weintraub, B., Cheng, S.Y., and Crawley, J.N. (1998). Hyperactivity and learning deficits in transgenic mice bearing a human mutant thyroid hormone beta1 receptor gene. *Learn Mem* 5, 289-301.
- McKusick, V.A., and Amberger, J.S. (1993). The morbid anatomy of the human genome: chromosomal location of mutations causing disease. *J Med Genet* 30, 1-26.
- Mineur, Y.S., and Crusio, W.E. (2002). Behavioral and neuroanatomical characterization of FVB/N inbred mice. *Brain Res Bull* 57, 41-47.
- Miwa, J.M., Ibanez-Tallon, I., Crabtree, G.W., Sanchez, R., Sali, A., Role, L.W., and Heintz, N. (1999). *lynx1*, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* 23, 105-114.
- Noel, L.S., Champion, B.R., Holley, C.L., Simmons, C.J., Morris, D.C., Payne, J.A., Lean, J.M., Chambers, T.J., Zaman, G., Lanyon, L.E., *et al.* (1998). RoBo-1, a novel member of the urokinase plasminogen activator receptor/CD59/Ly-6/snake toxin family selectively expressed in rat bone and growth plate cartilage. *J Biol Chem* 273, 3878-3883.
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H., *et al.* (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420, 563-573.
- Palacios, G. (1990a). A double immunocytochemical and histochemical technique for demonstration of cholinergic neurons and microglial cells in basal forebrain and neostriatum of the rat. *Neuroscience letters* 115, 13-18.
- Palacios, G. (1990b). The endomembrane system of cholinergic and non-cholinergic neurons in the medial septal nucleus and vertical limb of the diagonal band of Broca: a cytochemical and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 38, 563-571.
- Palmiter, R.D., Wilkie, T.M., Chen, H.Y., and Brinster, R.L. (1984). Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree. *Cell* 36, 869-877.
- Paxinos, G. (1990). *The human nervous system* (San Diego: Academic Press).
- Price, J., Turner, D., and Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 156-160.
- Pugh, P.L., Ahmed, S.F., Smith, M.I., Upton, N., and Hunter, A.J. (2004). A behavioural characterisation of the FVB/N mouse strain. *Behav Brain Res* 155, 283-289.

Rashid, M.H., Furue, H., Yoshimura, M., and Ueda, H. (2006). Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. *Pain* 125, 125-135.

Robbins, T.W., and Sahakian, B.J. (1979). "Paradoxical" effects of psychomotor stimulant drugs in hyperactive children from the standpoint of behavioural pharmacology. *Neuropharmacology* 18, 931-950.

Roth, M., Noyes, R., and Burrows, G.D. (1988). *Handbook of anxiety* (Amsterdam ; New York

New York, NY: Elsevier ;

Sole distributor for the USA and Canada, Elsevier Science Pub. Co.).

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schmidt, R.F., Thews, G., and Lang, F. (2000). *Physiologie des Menschen*, 28., korr. u. aktualisierte Aufl. edn (Berlin: Springer).

Schoch, S., Cibelli, G., and Thiel, G. (1996). Neuron-specific gene expression of synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism. *J Biol Chem* 271, 3317-3323.

Self, D.W. (2005). Molecular and genetic approaches for behavioral analysis of protein function. *Biol Psychiatry* 57, 1479-1484.

Shepherd, G.M. (1994). *Neurobiology*, 3rd edn (New York: Oxford University Press).

Siegel, G.J. (2006). *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*, 7th edn (Burlington, MA: Elsevier Academic).

Smith, R.F., Wiese, B.A., Wojzynski, M.K., Davison, D.B., and Worley, K.C. (1996). BCM Search Launcher--an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res* 6, 454-462.

Solberg, H., Lober, D., Eriksen, J., Ploug, M., Ronne, E., Behrendt, N., Dano, K., and Hoyer-Hansen, G. (1992). Identification and characterization of the murine cell surface receptor for the urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 205, 451-458.

Stein, M.A., Weiss, R.E., and Refetoff, S. (1995). Neurocognitive characteristics of individuals with resistance to thyroid hormone: comparisons with individuals with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Dev Behav Pediatr* 16, 406-411.

Stevens, K.E., and Wear, K.D. (1997). Normalizing effects of nicotine and a novel nicotinic agonist on hippocampal auditory gating in two animal models. *Pharmacol Biochem Behav* 57, 869-874.

Street, K.A., Xu, G., Hall, K.L., Intano, G.W., McCarrey, J.R., Herbert, D.C., Kilimann, M.W., and Walter, C.A. (2005). Rat synapsin 1 promoter mediated transgene expression in testicular cell types. *DNA and cell biology* 24, 133-140.

Stroncek, D.F., Caruccio, L., and Bettinotti, M. (2004). CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *J Transl Med* 2, 8.

Sulzer, D., Chen, T.K., Lau, Y.Y., Kristensen, H., Rayport, S., and Ewing, A. (1995). Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci* 15, 4102-4108.

Svensson, M., Skold, K., Nilsson, A., Falth, M., Svenningsson, P., and Andren, P.E. (2007). Neuropeptidomics: expanding proteomics downwards. *Biochemical Society transactions* 35, 588-593.

Takahata, R., and Moghaddam, B. (2003). Activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex sustains the motoric and dopaminergic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* 28, 1117-1124.

Tsetlin, V. (1999). Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur J Biochem* 264, 281-286.

Tsuji, H., Okamoto, K., Matsuzaka, Y., Iizuka, H., Tamiya, G., and Inoko, H. (2003). SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris. *Genomics* 81, 26-33.

Udenfriend, S., and Kodukula, K. (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 64, 563-591.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Voikar, V., Koks, S., Vasar, E., and Rauvala, H. (2001). Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 72, 271-281.

von Euler, U.S., and Gaddum, J.H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72, 74-87.

- Wagner, G.C., Ricaurte, G.A., Johanson, C.E., Schuster, C.R., and Seiden, L.S. (1980). Amphetamine induces depletion of dopamine and loss of dopamine uptake sites in caudate. *Neurology* 30, 547-550.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.
- Wilhelm, O.G., Wilhelm, S., Escott, G.M., Lutz, V., Magdolen, V., Schmitt, M., Rifkin, D.B., Wilson, E.L., Graeff, H., and Brunner, G. (1999). Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J Cell Physiol* 180, 225-235.
- Woolfe, G., and MacDonald, A.D. (1944). The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80, 300-307.
- Zhang, Z., and Henzel, W.J. (2004). Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. *Protein Sci* 13, 2819-2824.
- Zhuang, X., Oosting, R.S., Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Miller, G.W., Caron, M.G., and Hen, R. (2001). Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1982-1987.

8. Anhang

8.1 Publikationsliste

Bilkei-Gorzo A., Rácz I., Michel K., Darvas M., Maldonado R., and Zimmer A. (2007)
A common genetic predisposition to stress-sensitivity and stress-induced nicotine craving.
Biol. Psychiat. In press.

Darvas M., Morsch M., Racz I., Ahmadi S., Swandulla D., and Zimmer A. (2007)
Lypd6: A novel modulator of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In preparation

8.2 Danksagung

Allen Mitgliedern des Instituts möchte ich hiermit herzlich für die kollegiale Unterstützung bei der Durchführung meiner Dissertation danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. A. Zimmer für seine langjährige Unterstützung, für die Möglichkeit in seinem Labor am Uniklinikum Bonn promovieren zu dürfen, besonders für die vielen fachlichen Ratschläge, die für die Durchführung dieser Arbeit sehr wichtig waren, und für die Korrektur des Manuskripts.

Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. D. Swandulla, Herrn Dr. S. Ahmadi und Herrn M. Morsch für die Durchführung der elektrophysiologischen Arbeiten danken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. J. Alferink, Frau Dr. I. Racz, Frau M. Barcena, Frau Dr. M. Karsak, Herrn Dr. A. Bilkei-Gorzo und Herrn Dr. D.-M. Otte für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für Korrekturen des Manuskripts.

8.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte, fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen sind ebenfalls als solche gekennzeichnet.